



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Aprovechamiento de la actividad
antioxidante de extractos y aceites
esenciales de romero (*Rosmarinus
officinalis* L.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y
menta (*Mentha spicata* L.) como aditivo
funcional en aceites comestibles**

Yamid Ortiz Rojas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2016

Aprovechamiento de la actividad antioxidante de extractos y aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y menta (*Mentha spicata* L.) como aditivo funcional en aceites comestibles

Yamid Ortiz Rojas

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Directora:

Dr. rer. hort. Claudia Patricia Pérez Rodríguez

Investigación sobre sustancias con capacidad antioxidante en alimentos

Grupo de investigación en Poscosecha de Productos Agrícolas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Posgrado en Ciencia y Tecnología de alimentos

Bogotá, Colombia

2016

A mis padres y hermanos por confiar y brindarme su apoyo constante.

A mi esposa por su amor infinito

A mis amigos que me acompañaron en todo este proceso, en especial a Rafa, Alejo, Adri, Didi, Cami y Yu.

A todos aquellos que me brindaron su voz de aliento y apoyo en las horas oscuras.

A Tobita y Negro por acompañarme en las largas noches.

A la memoria de Blanca (I)

Agradecimientos

Agradezco especialmente a la ingeniera Claudia Patricia Pérez Rodríguez del Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola por su apoyo incondicional, al Departamento de Química, al Departamento de Ingeniería Química, mi eterna alma mater y donde siempre encuentro apoyo y consejo y al ingeniero Luis Ignacio Rodríguez por sus invaluable aportes, a Ricardo Cortez por su apoyo en los laboratorios de ingeniería química (LIQ). Un agradecimiento especial a los miembros del semillero de investigación en poscosecha de productos agrícolas por su invaluable apoyo y esfuerzos.

Resumen

El uso de aditivos en alimentos es necesario en la industria debido a la alteración de las propiedades de las materias primas al ser procesadas y transformadas. Aditivos tales como colorantes, saborizantes, plastificantes y antioxidantes son empleados para mejorar y/o modificar los parámetros sensoriales y de calidad en los productos finales. Uno de los aditivos cruciales son los antioxidantes, los cuales, al disminuir la velocidad de oxidación de los lípidos presentes en las matrices alimenticias, previenen el desarrollo de *off-flavours*, con la consecuente pérdida de calidad sensorial y nutricional. En el presente trabajo se evaluó la posibilidad de utilizar aceite esencial, proveniente de tres especies de plantas aromáticas (*Mentha spicata* L, *Rosmarinus officinalis* y *Mentha spicata* L) irradiadas con UV-B, como antioxidante y valorar su posible aplicación para la industria de alimentos, en especial para la industria de grasas y aceites.

Para el caso de *Mentha spicata*, la aplicación de radiación UV-B en conjunción a tiempo de adaptación permitió un aumento de la cantidad de aceite esencial de cerca de 18% en comparación al control sin ningún tipo de tratamiento, mientras que su capacidad antioxidante mostró ser similar a la brindada por BHA (Butilhidroxianisol) y BHT (Butilhidroxitolueno), antioxidantes sintéticos de uso común en la industria de alimentos y que se emplearon a modo de referencia en los ensayos de oxidación.

En *Thymus vulgaris*, la aplicación de los tratamientos generó un aumento en la cantidad de fenoles totales en una de las combinaciones de los tratamientos ($D1=0.05 \text{ W} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^{-2}$ y $T2= 48$ horas) y a su vez un aumento en la capacidad antioxidante, que si se empleara este aceite esencial proveniente de material irradiado y sometido a tiempo de adaptación, podría alargar la vida útil de un aceite vegetal comestible en casi el doble de tiempo en comparación a si se empleara alguno de los antioxidantes sintéticos de referencia.

Para *Rosmarinus officinalis* se evidencio un aumento en la cantidad de fenoles totales medidos e igualmente un aumento en la capacidad antioxidante de sus extractos al ser sometidos a los tratamientos de radiación – tiempo de adaptación, con lo cual se podría aumentar la vida útil de un aceite vegetal para consumo humano en más del doble que si se emplea algún antioxidante sintético empleando la misma concentración que un antioxidante sintético sin el inconveniente que representa el actual rechazo de un sector de los consumidores al considerar peligrosos los antioxidantes sintéticos.

Palabras clave: Aceite vegetal, oxidación lipídica, antioxidante, polifenoles, radiación ultravioleta, ranciamiento

Abstract

The use of additives in food is needed in the industry due to the alteration of the properties of the raw materials to be processed and transformed. Additives such as colorants, flavors, plasticizers and antioxidants are used to improve and / or modify sensory parameters and quality in the final products. One of the crucial additives are antioxidants, which, by reducing the rate of oxidation of the lipids present in food matrices, prevent the development of *off-flavors*, with consequent loss of sensory and nutritional quality. In this work the possibility of using essential oil was evaluated from three species of herbs (*Mentha spicata* L, *Rosmarinus officinalis* and *Mentha spicata* L) irradiated with UV-B, as an antioxidant and assess its possible application for the food industry, particularly for fats and oils industry.

In the case of *Mentha spicata*, application of UV-B radiation conjunct adaptation time allowed an increase in the amount of essential oil of about 18% compared to the control without any treatment, while its antioxidant capacity showed be similar to that provided by BHA (Butylated hydroxyanisole) and BHT (Butylated hydroxytoluene), synthetic antioxidants commonly used in the food industry and were used as reference in the oxidation tests.

In *Thymus vulgaris*, the application of the treatments generated an increase of total phenols in one of the treatment combinations ($D1 = 0.05 \text{ W. h .m}^{-2}$ and $T2 = 48$ hours) and also increased antioxidant capacity, if this essential oil from irradiated and subjected to adaptation time material is employed, it may extend the life of or edible vegetable oil in almost twice as long compared to if employed any of the synthetic antioxidants used as reference.

For *Rosmarinus officinalis*, increasing of the amount of measured total phenols and also an increasing in the antioxidant capacity of extracts when subjected to radiation -

adaptation time treatments were evidenced. If these essential oils were used as additive in vegetable oil for human consumption, lifespan could be expanded more than double that if any synthetic antioxidant is employed using the same concentration as a synthetic antioxidant without the inconvenience of the current rejection of a sector of consumers concerning hazardous synthetic antioxidants.

Keywords: Vegetable oil, lipid oxidation, polyphenols, ultraviolet radiation, rancidity

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
1. Introducción	1
2. Planteamiento del problema	3
3. Justificación	5
4. Objetivos	7
4.1 Objetivo general.....	7
4.2 Objetivos específicos	7
5. Revisión de literatura	9
5.1 Antioxidantes en alimentos	9
5.1.1 Antioxidantes sintéticos.....	9
5.1.2 Antioxidantes naturales	11
5.1.3 Oxidación en aceites comestibles	11
5.1.4 Técnicas de medición de capacidad antioxidante.....	14
5.1.5 Técnicas de medición de oxidación en alimentos.....	15
5.2 Plantas aromáticas y especias.....	18
5.2.1 Métodos de obtención de aceites esenciales y extractos de plantas aromáticas.....	19
5.2.2 <i>Menta spicata</i> L.....	22
5.2.3 <i>Thymus vulgaris</i> L.....	25
5.2.4 <i>Rosmarinus officinalis</i> L	26
5.3 Producción de plantas aromáticas en Colombia	27
5.4 Elicitores en plantas.....	29
5.4.1 Radiación UV-B como elicitador fitoquímico.....	29
6. Metodología	33
6.1.1 Recepción del material, radiación y procesamiento.....	34
6.1.2 Extracción de aceites esenciales	35
6.1.3 Determinación del contenido de fenoles y flavonoides en el material vegetal y análisis de capacidad antioxidante de los aceites esenciales.....	36

6.1.4	Análisis estadístico	39
7.	Resultados y discusión	41
7.1	<i>Mentha spicata</i> L.....	41
7.1.1	Contenido de aceite esencial	41
7.1.2	Contenido de fenoles y flavonoides	43
7.1.3	Dienos Conjugados	45
7.1.4	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	47
7.2	<i>Thymus vulgaris</i> L.....	48
7.2.1	Contenido de aceite esencial	48
7.2.2	Contenido de fenoles y flavonoides	49
7.2.3	Dienos Conjugados	51
7.2.4	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	52
7.3	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	55
7.3.1	Contenido de aceite esencial	55
9	Contenido de fenoles y flavonoides	56
7.3.2	Dienos Conjugados	57
7.3.3	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	58
8.	Conclusiones y recomendaciones	61
8.1	Conclusiones.....	61
8.2	Recomendaciones.....	65
A.	Anexo: Tablas de datos de resultados.....	67
	Bibliografía	75

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 Estructura de antioxidantes sintéticos.....	10
Figura 2. Esquema simplificado de la autooxidación de lípidos.	12
Figura 3. Esquema de reacción del ácido tiobarbitúrico con malonaldehído.....	17
Figura 4. Algunos de los compuestos presentes en aceites esenciales.....	19
Figura 5. Estructura de algunos de los compuestos reportados en <i>Mentha spicata</i> L.....	24
Figura 6. Estructura del ácido rosmarínico	25
Figura 7. Datos de producción de plantas aromáticas en Colombia (2007 – 2014)	28
Figura 8. Diseño experimental para la etapa 1	33
Figura 9. Esquema del montaje de extracción con arrastre con vapor.....	35
Figura 10. Detalle del cuello de cisne	36
Figura 11. Diseño experimental ensayo de oxidación acelerado en estufa.....	38
Figura 12. Contenido de aceite esencial (% base seca) para muestras de <i>Mentha spicata</i> L sometidas a radiación.....	42
Figura 13. Contenido promedio total de fenoles para <i>Mentha spicata</i> L expresado en mg ácido gálico por mg de materia seca.	43
Figura 14. Contenido total promedio de flavonoides para <i>Mentha spicata</i> L expresado en mg de quercetina por mg de materia seca.....	44
Figura 15. Concentración de dienos conjugados con respecto al tiempo para los aceites esenciales de <i>Mentha spicata</i> L	46
Figura 16. Concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) con respecto al tiempo para los aceites esenciales de <i>Mentha spicata</i> L.....	47
Figura 17. Contenido de aceite esencial (% base seca) para muestras de <i>Thymus vulgaris</i> L sometidas a radiación.....	49
Figura 18. Contenido promedio total de fenoles para <i>Thymus vulgaris</i> expresado en mg ácido gálico por mg de materia seca.	49

Figura 19. Contenido total promedio de flavonoides para <i>Thymus vulgaris</i> expresado en mg de quercetina por mg de materia seca.	50
Figura 20. Concentración de dienos conjugados a través del tiempo para muestras de aceite aditivadas con aceite esencial proveniente de <i>Thymus vulgaris</i> sometido a radiación.	51
Figura 21. Concentración de TBARS (mg MDA/ kg aceite) a través del tiempo para muestras de aceite aditivadas con aceite esencial proveniente de <i>Thymus vulgaris</i> sometido a radiación.	53
Figura 22. Contenido de aceite esencial (% base seca) para muestras de <i>Rosmarinus officinalis</i> L sometidas a radiación.	55
Figura 23. Contenido promedio total de fenoles en muestras de <i>Rosmarinus officinalis</i> sometidas a radiación UV-B expresado en mg ácido gálico por mg de materia seca.	56
Figura 24. Contenido total promedio de flavonoides en muestras de <i>Rosmarinus officinallis</i> sometidas a radiación UV-B expresado en mg de quercetina por mg de materia seca. ..	57
Figura 25. Concentración de dienos conjugados a través del tiempo para <i>Rosmarinus officinalis</i> expresados en mmol dienos/ kg de aceite.	58
Figura 26 Concentración de TBARS (mg MDA/ kg aceite) a través del tiempo para muestras de aceite aditivadas con aceite esencial proveniente de <i>Rosmarinus officinalis</i> L sometido a radiación	59

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Otros compuestos reportados en <i>Mentha spicata</i> L.....	23
Tabla 2. Porcentajes de contenido de aceite esencial para <i>Mentha spicata</i> L.	67
Tabla 3. Promedio de contenido de polifenoles (mg ácido gálico/ mg materia seca) y flavonoides (mg quercetina/ mg materia seca)	67
Tabla 4. Valores de dienos conjugados de aceite vegetal sometido a oxidación y aditivado con aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> (mmol Hidroperóxidos/ kg aceite).	68
Tabla 5. Datos de TBARS para aceite vegetal aditivado con aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> (mg MDA / kg aceite).....	68
Tabla 6. Datos de Contenido de aceite esencial, cantidad de fenoles y flavonoides para muestras de <i>Thymus vulgaris</i> sometidas a radiación UV-B y dos tiempos de adaptación.	69
Tabla 7. Concentración de dienos conjugados a través del tiempo medidos en aceite vegetal comestible aditivado con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> sometido previamente a radiación, BHA, BHT y controles (mmol dienos/ kg aceite).....	70
Tabla 8. Concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico a través del tiempo medidos en aceite vegetal comestible aditivado con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> sometido previamente a radiación, BHA, BHT y controles (mmol MDA/ kg aceite).....	70
Tabla 9. Datos de Rendimiento de extracción de aceite esencial, cantidad de fenoles y flavonoides para muestras de <i>Rosmarinus officinalis</i> L sometidas a radiación UV-B y dos tiempos de adaptación. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p > 0.5$).	71
Tabla 10. Concentración de dienos conjugados a través del tiempo medidos en aceite vegetal comestible aditivado con aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> sometido previamente a radiación, BHA, BHT y controles (mmol dienos/ kg aceite). Letras distintas muestran diferencia significativa entre los valores según el test de Tukey ($p > 0,5$).	73

Tabla 11. Concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico a través del tiempo medidos en aceite vegetal comestible aditivado con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sometido previamente a radiación, BHA, BHT y controles (mmol MDA/ kg aceite). Letras distintas muestran diferencia significativa entre los valores según el test de Tukey ($p > 0,5$). 74

1.Introducción

Los alimentos, al ser constituidos de diversos tipos de compuestos como carbohidratos, proteínas, lípidos, agua entre otros, son susceptibles de procesos de degradación. Estos procesos pueden tener origen químico, físico o biológico y generan productos que alteran la calidad nutricional y sensorial de los alimentos, lo que redundaría en pérdidas económicas para las empresas y la sociedad (Fennema, Parkin, & Damodaran, 2008).

Entre los procesos que generan mayor impacto en el sabor y olor de un alimento es la degradación de lípidos (Halliwell, 1999). Los lípidos son moléculas compuestas de 3 ácidos grasos unidas a una molécula de glicerol. Los ácidos grasos, al presentar insaturaciones en su estructura son propensos a reaccionar con especies reactivas de oxígeno, formando radicales que inician una serie de reacciones sucesivas y que terminan originando sustancias como hidroperóxidos, ácidos, cetonas entre otros que, además de alterar el flavour del alimento, pueden ser tóxicos para el consumidor (Gunstone, 2011). Con el fin de disminuir el impacto de los procesos de degradación de los alimentos se han desarrollado variedad de estrategias. En el caso de los procesos de degradación de lípidos, una de las estrategias más empleadas es la adición de sustancias o compuestos con capacidad antioxidante, los cuales son sustancias que, bien sea por la inactivación de especies reactivas de oxígeno o por la estabilización de los productos intermedios de las reacciones de oxidación, disminuyen la velocidad de oxidación o degradación de los lípidos (Yanishlieva, Gordon, & Pokorný, 2001).

Los antioxidantes más usados a nivel comercial son los de origen sintético, sin embargo, debido a las exigencias de un mercado que cada vez prefiere consumir menos sustancias provenientes de fuentes sintéticas, la búsqueda de antioxidantes de origen natural ha tomado fuerza en las últimas décadas (Chen, Shi, & Ho, 1992; Peschel, Sánchez-Rabaneda et al., 2006).

Una fuente promisoría de compuestos antioxidantes son los extractos provenientes de plantas aromáticas, que, aparte de tener sustancias con diversas capacidades y beneficios para la salud tanto humana como animal, pueden añadir características sensoriales deseables a los alimentos en que se incorporen (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

El empleo de elicitores para mejorar la calidad de productos vegetales es una tecnología emergente en el campo de los procesos de poscosecha. Se ha demostrado que al aplicar radiación UV-B en plantas aromáticas, aumenta la cantidad de metabolitos secundarios generados por las células vegetales, lo cual permite obtener extractos enriquecidos en estos metabolitos (Cisneros-Zevallos, 2003).

El presente trabajo estudió la actividad antioxidante de los extractos y aceites esenciales procedentes de plantas aromáticas sometidas a tratamiento UV-B como tecnología poscosecha y su utilización como aditivo antioxidante en aceites comestibles en condiciones de oxidación acelerada para evaluar su posible utilización como aditivo antioxidante para alargar la vida útil de estos aceites vegetales.

2. Planteamiento del problema

La oxidación de aceites comestibles sucede cuando éstos se encuentran en contacto con oxígeno atmosférico, lo cual reduce su calidad por generar enranciamiento. Algunos de los efectos de la oxidación pueden ser rectificables empleando procesamiento extra sobre la materia prima afectada, generando sobre costo, sin embargo, si el daño generado es severo, no es posible su rectificación (Joint Fao/Who Codex Alimentarius Commission, 2001).

Las reacciones de oxidación pueden alterar el *flavor* y la calidad nutricional de los alimentos, debido a la generación de compuestos volátiles y *off-flavors*, además pueden generarse compuestos peligrosos para la salud humana, todo esto produciendo menor aceptación o rechazo por parte del consumidor de estos productos. La disminución de la calidad nutricional se debe al consumo de los ácidos grasos insaturados, benéficos para la salud humana y que constituyen el punto de partida de los procesos de oxidación de lípidos (Teranishi, Wick, & Hornstein, 1999).

Para disminuir el impacto que tienen los procesos de oxidación sobre aceites comestibles, es común el empleo de aditivos antioxidantes de origen sintético, para suplir la ausencia de sustancias tales como tocoferoles, que brindan protección natural a los aceites vegetales, pero que se pierden en los procesos de refinación de los mismos.

Los antioxidantes se pueden clasificar de diversas maneras. Según su origen se pueden dividir en sintéticos y naturales; según su mecanismo de acción en enzimáticos y no enzimáticos; y según la etapa de oxidación en la cual actúan, si actúan sobre la etapa de iniciación se denominan primarios, si actúan sobre la etapa de propagación secundarios, y si actúan en ambas mixtos (Bailey & Shahidi, 2005).

Los antioxidantes sintéticos tienen como principal ventaja su bajo costo y alta eficacia; sin embargo, son punto de debate debido a numerosos estudios que los han relacionado con

diversos efectos adversos sobre la salud humana y la tendencia de los consumidores actuales en adquirir alimentos sin ingredientes de origen sintéticos (Carocho & Ferreira, 2013; Shahidi, 2015).

Las plantas aromáticas se han asociado tradicionalmente con efectos terapéuticos en la medicina tradicional, y estudios sobre estas plantas han demostrado la presencia de compuestos con capacidad antioxidante y antimicrobiana, generando un especial interés en su estudio y aplicación en áreas como cosméticos y alimentos (Peter, 2004a). Las propiedades antioxidantes de las plantas dependen de su variedad, condiciones ambientales, clima y factores estacionales, así como de la región de cultivo, grado de crecimiento y otros factores como tratamientos poscosecha y procesamiento. Para una adecuada determinación del potencial antioxidante de una planta se tiene como parámetros de interés la técnica de extracción y sus condiciones, solventes empleados y la matriz en la cual se desea aplicar (Škrovánková, Mišurcová, & Machů, 2012).

El presente trabajo surgió de las inquietudes del grupo de investigación Poscosecha de Productos Agrícolas, del Departamento de Ingeniería Agrícola y Civil sobre como la incidencia de luz ultravioleta en plantas aromáticas influye en la producción de sustancias antioxidantes y su aplicación práctica como aditivo en un alimento como lo son los aceites vegetales comestibles.

3. Justificación

Los aceites esenciales son mezclas de compuestos volátiles que son sintetizados por las plantas y extraídos empleando vapor de agua. La cantidad de compuestos que pueden estar presentes en un aceite esencial puede llegar a rondar los 100 y sus diversas funciones químicas y estructuras les brindan propiedades sensoriales y funcionales atractivas para el ser humano.

Muchos aceites esenciales tienen capacidad antioxidante, y el uso de éstos es un campo de interés creciente debido que algunos antioxidantes sintéticos tradicionalmente empleados tales como el BHA y el BHT se sospecha que tienen efectos adversos en la salud humana.

Los aceites esenciales deben su capacidad antioxidante a compuestos terpenoides y fenilpropanoides, y ambas familias comprenden compuestos fenólicos y en general, los compuestos fenólicos, actúan como antioxidantes debido a su alta reactividad con los radicales peróxidos.

Por otra parte, el empleo de elicitors en hierbas aromáticas estimula la síntesis de aceites esenciales y de alguno de sus principales compuestos, así que, el aceite esencial obtenido a partir de una planta tratada con algún elicitor puede tener una capacidad antioxidante mayor.

El estudio de los aceites esenciales obtenidos de muestras de 3 especies de plantas aromáticas sometidas a radiación UV-B y su empleo como aditivo antioxidante en aceite vegetal apto para consumo humano es el punto de partida para el desarrollo de nuevos aditivos a partir de materias primas naturales estimuladas con elicitors así como la implementación de una industria de transformación de plantas aromáticas en la cual se les dé un valor agregado de

interés para otras industrias así como para el consumidor final, constituyéndose ambas en innovaciones técnicas de interés para la industria de alimentos.

.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Evaluar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales obtenidos a partir de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.) Y menta (*Mentha spicata* L.) sometido a radiación UV-B como tratamiento poscosecha y su aplicación como aditivo antioxidante en aceite vegetal comestible

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la aplicación de radiación UV-B en el rendimiento de los aceites esenciales obtenidos de las plantas aromáticas en estudio.
- Determinar los cambios en la concentración de fenoles y flavonoides debido a la aplicación de radiación UV-B en la materia seca de las plantas aromáticas en estudio
- Evaluar la actividad antioxidante de los aceites obtenidos a partir del material sometido a radiación en una matriz de aceite comestible libre de antioxidantes a través de la aplicación de dichos aceites en aceite vegetal comestible.

5.Revisión de literatura

5.1 Antioxidantes en alimentos

Los antioxidantes en alimentos pueden ser definidos como cualquier sustancia que es capaz de retrasar, retardar o prevenir el desarrollo de rancidez u otros tipos de deterioro en el *flavor* de un alimento debido a la oxidación. Los antioxidantes retardan el desarrollo de rancidez al extender el periodo de inducción. La adición de antioxidantes después de este periodo tiende a no tener utilidad alguna, pues no tiene efecto sobre la generación de *off-flavours*.

Los compuestos antioxidantes primarios más comunes son los polifenoles, y entre ellos se destaca el α tocoferol. Estas sustancias se consumen durante el periodo de inducción. Los antioxidantes secundarios actúan a través de mecanismos variados incluyendo la unión a iones metálicos, secuestro de oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación de oxígeno singulete. Normalmente los antioxidantes secundarios presentan actividad antioxidante en la presencia de componentes secundarios menores, como en el caso del ácido cítrico, el cual puede actuar como agente secuestrante en la presencia de iones metálicos o el ácido ascórbico, el cual es efectivo en presencia de tocoferoles u otros antioxidantes primarios(Bailey & Shahidi, 2005).

5.1.1 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son mono o dihidrofenoles que reaccionan con un radical peroxilo originando un radical fenoxi, el cual es estable debido a una amplia delocalización de un electrón impar en el sistema aromático. Los antioxidantes sintéticos más empleados en la industria de alimentos se pueden observar en la Figura 1. Estos son compuestos sólidos y se emplean en soluciones de propilenglicol, monoacilgliceroles o aceites vegetales.

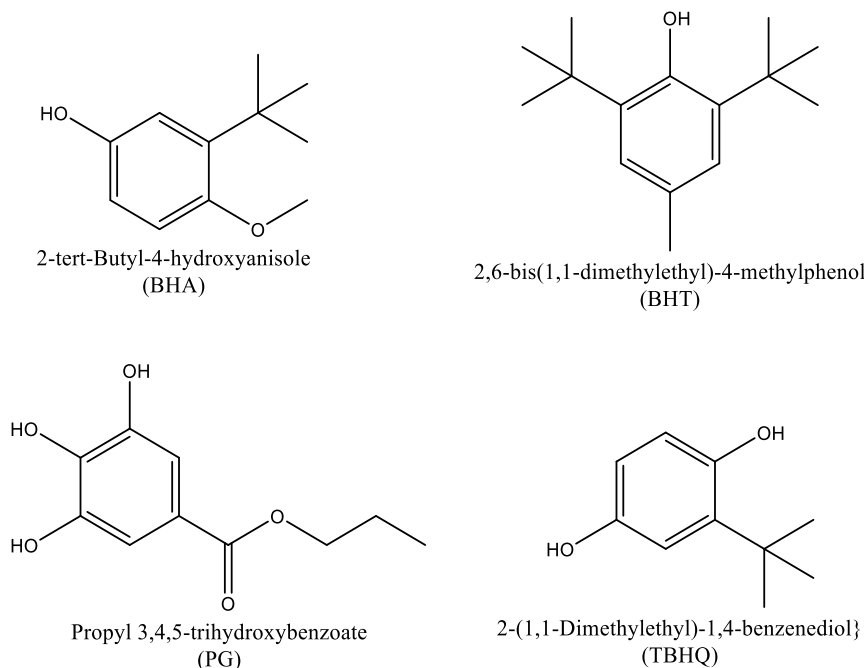


Figura 1 Estructura de antioxidantes sintéticos

EL Butil hidroxianisol (BHA) tiene buena solubilidad en sistemas grasos y responde de manera adecuada en procesos de fritura y productos de panadería. Es efectivo en grasas de origen animal pero no lo es tanto en aceites vegetales, muestra sinergismo con otros compuestos como Butil hidroxytolueno (BHT) y galato de propilo (PG), se acostumbra a usar a una concentración máxima de 200 ppm.

Butil hidroxytolueno es menos soluble que el BHA y no es soluble en propilenglicol, que se emplea frecuentemente como solvente para antioxidantes, posee sinergismo con el BHA, pero no con galato de propilo y al igual que el BHA se emplea a máximo 200 ppm. Por otra parte, el galato de propilo es menos soluble que los dos anteriores y al descomponerse a 148°C, no es aconsejable para su empleo en aceites de fritura. Sin embargo, es efectivo al emplearse junto a BHA y puede ser empleado en concentraciones alrededor de 100 ppm.

La terbutil hidroquinona (TBHQ) se encuentra aceptado en USA y en algunos otros países, pero se encuentra prohibido en la Unión Europea, es muy efectivo en aceites vegetales, tiene buena solubilidad y estabilidad a altas temperaturas (van Esch, 1986). Se emplea de manera frecuente en el transporte y almacenamiento de aceites vegetales y se puede remover completamente durante el proceso de deodorización. (Gunstone, 2004)

5.1.2 Antioxidantes naturales

Los sistemas biológicos tienen distintos mecanismos para afrontar los procesos de oxidación que se derivan de su interacción con el medio. Los mecanismos antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos. En el caso de los antioxidantes no enzimáticos, son moléculas de diversos grupos químicos que actúan retardando y/o inhibiendo la formación o propagación de especies radicales, entre los grupos más comunes se pueden mencionar polifenoles, flavonoides, tocoferoles y tocotrienoles (Yanishlieva, Gordon et al., 2001)

Los antioxidantes de origen natural más conocidos y empleados son los tocoferoles y tocotrienoles, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en productos derivados de vegetales, pero no así en los productos obtenidos de tejidos animales. Existen 8 tocoles naturales (4 tocoferoles con una cadena lateral fitilica y difieren entre sí en el número y disposición de los grupos metilo y 4 tocotrienoles los cuales son similares a sus correspondientes tocoferoles pero tienen una cadena lateral triple insaturada (McClements, Decker, & Elias, 2010).

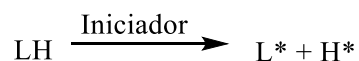
5.1.3 Oxidación en aceites comestibles

Los aceites comestibles son susceptibles a los procesos de oxidación en la presencia de catalizadores como luz, calor, enzimas, metales, metaloproteínas y microorganismos, desarrollándose *off-flavors* y acarreando la pérdida de ácidos grasos esenciales, vitaminas y otros compuestos de importancia biológica. Los procesos de oxidación se pueden clasificar en autooxidación, foto-oxidación, oxidación térmica y oxidación enzimática, presentándose uno o varios de estos procesos al mismo tiempo (O'Brien, Farr, & Wan, 2000).

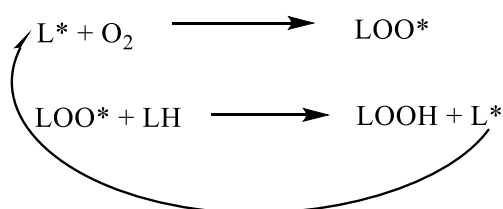
La autooxidación es el proceso más común de deterioro y es definido como la reacción espontánea del oxígeno atmosférico con los lípidos. El proceso puede ser acelerado a altas temperaturas como a las que se someten el aceite en los procesos de freído, lo cual es llamado oxidación térmica. En estas condiciones se incrementa la concentración de ácidos grasos libres, el contenido de sustancias polares y se generan cambios físicos como la formación de espuma, cambio de color y viscosidad (Yanishlieva, Gordon et al., 2001).

Generalmente se ha aceptado que los procesos de autooxidación y oxidación térmica se desarrollan a través de una reacción en cadena de radicales libres de 3 etapas (iniciación, propagación y terminación) (Kamal-Eldin, 2003) a continuación se puede observar un esquema simplificado del mecanismo de oxidación (Figura 2).

Iniciación:



Propagación:



Terminación:

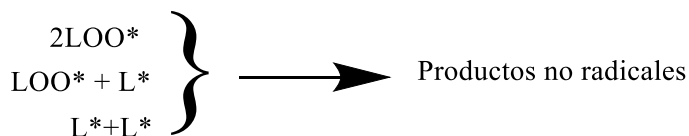


Figura 2. Esquema simplificado de la autooxidación de lípidos.

La primera etapa de oxidación sucede a velocidades muy lentas, y el tiempo necesario para alcanzar un cambio repentino en la velocidad de oxidación se le conoce como el tiempo o periodo de inducción. Los hidroperóxidos han sido identificados como los productos primarios de autooxidación; la descomposición de los hidroperóxidos produce aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles y compuestos epóxidos, que son los productos secundarios de oxidación. Estos compuestos, junto a los radicales libres, constituyen la base para la medición de la oxidación de grasas y aceites.

Para iniciar el proceso de autooxidación se debe de contar con la presencia de luz y un agente sensibilizador como por ejemplo clorofila. El oxígeno pasa de su estado triplete a singlete, que es reactivo y juega un papel importante en la iniciación de las reacciones de oxidación.

Otra ruta de importancia en las reacciones de oxidación es la reacción de Fenton, en esta clase de reacción, iones metálicos como por ejemplo hierro y cobre, catalizan la reacción de descomposición del peróxido de hidrogeno, originando radicales altamente reactivos, que a su vez interactúan con los dobles o triples enlaces de los lípidos, iniciando el proceso de oxidación.

La oxidación enzimática de aceites envuelve la acción de la enzima lipoxigenasa que se encuentra presente en tejidos vegetales como por ejemplo soya, pera y tomate. Ésta enzima puede generar deterioro de los lípidos durante la extracción del aceite, pero también juegan un papel importante en la generación de *flavours* deseables en vegetales durante el proceso de masticación.

Se ha encontrado que la estabilidad de los aceites está directamente relacionada con el contenido de ácidos grasos insaturados. A esto se le ha llamado estabilidad inherente (Erickson, 1996), y se puede calcular con los niveles de cada uno de los ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico y linolénico) y su reactividad relativa con el oxígeno; a mayor estabilidad inherente, es menos adecuado para su almacenamiento y procesamiento posterior, así que es necesario hidrogenar parcialmente para que su desempeño mejore de manera sustancial, como varios estudios lo han demostrado (Robert, Masson, & Romero 2001).

La estabilidad oxidativa de los aceites puede ser determinada por la distribución, geometría y número de dobles enlaces de las moléculas de glicéridos presentes. La oxidación solo se puede presentar en las porciones de ácidos grasos insaturados de la molécula de triglicérido debido a que la presencia de dobles enlaces es necesario para que la oxidación ocurra en condiciones ordinarias. Se ha encontrado que los isómeros *cis* de ácidos grasos se oxidan más rápidamente que los isómeros *trans*. Los dobles enlaces conjugados son más reactivos que los dobles enlaces no conjugados y los polinsaturados son más reactivos que los monoinsaturados (O'Brien, 1998).

La oxidabilidad de los ácidos grasos insaturados puede ser estimada por el incremento de grupos metileno activos localizados entre dos enlaces. Según este comportamiento, la oxidabilidad de cada ácido graso se incrementa dos veces por cada grupo metil activo (Frankel, 1989).

5.1.4 Técnicas de medición de capacidad antioxidante

Para medir la capacidad antioxidante de un compuesto o una mezcla de compuesto se pueden aplicar técnicas de oxidación acelerada sobre un sustrato o emplear una fuente de radicales libres sintética y medir, generalmente a través de espectrofotometría, la cantidad de radicales libres presentes en la solución. La principal limitación de estas técnicas es que se ha probado que las fuentes de radicales libres empleadas son químicamente diferentes a los responsables de los procesos de oxidación en sistemas reales y por la ausencia de sustratos oxidables. Los resultados de estas pruebas indican “poder de eliminación de radicales” en vez de una verdadera actividad antioxidante. Esto significa que las moléculas capaces de reducir tales compuestos no necesariamente son capaces de detener la cadena oxidativa.

Prueba del DPPH: un antioxidante o cualquier molécula con un enlace X-H débil, reacciona con el radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), causando una decoloración en la solución que puede ser medida a 520 nm. Los resultados se expresan generalmente en una relación IC₅₀, definida como la concentración de antioxidante potencial necesario para disminuir en un 50% la absorbancia inicial de la solución del radical. Debido que depende del tiempo de reacción, tomar este único parámetro no provee información significativa de la verdadera reactividad del antioxidante; más aún, los datos solo pueden ser comparados cuando son obtenidos bajo condiciones de reacción idénticas.

Prueba TEAC (Trolox-equivalent Antioxidant Capacity, Capacidad Antioxidante equivalente Trolox): Un antioxidante, o cualquier agente reductor X, reaccionan con el radical ABTS.⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), el cual presenta una fuerte banda de absorción en el rango de 600 a 750 nm y se compara su decoloración frente al producido por un estándar de Trolox. Tiene desventajas similares a las presentadas por la prueba de DPPH.

Prueba FRAP: en la prueba FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power, Poder antioxidante Reductor del ion Férrico) se emplea una solución de Fe³⁺ que se reduce a Fe²⁺, el cual forma un complejo coloreado con 2,4,6-tripiridil-s-triazina y se mide su absorbancia a 590 nm.

Prueba de Follin – Ciocalteu: El antioxidante es oxidado en un medio básico formado por una mezcla de sales de tungsteno y molibdeno (reactivo de Follin – Ciocalteu) con la

consecuente formación de iones MoO^{4+} que pueden ser cuantificados a 750 nm. Se emplea ácido gálico como patrón para elaborar curvas de calibración. Esta prueba, al igual que la prueba FRAP, no incluye una reacción con radicales; debido a esto, estos ensayos simplemente indican alguna habilidad reductora de potenciales sustancias antioxidantes.

5.1.5 Técnicas de medición de oxidación en alimentos.

La capacidad antioxidante de diversas sustancias se puede medir de manera *in vitro* a través de diversos ensayos, que pueden ser divididos en dos grupos:

- Métodos que evalúan la formación de peróxidos.
- Métodos que miden la capacidad de secuestro o inactivación de radicales libres.

Para la medición de la formación de peróxidos se pueden emplear muchos sustratos como por ejemplo aceites y grasas, ácido linoleico, esterios metílicos de ácidos grasos y lipoproteínas de baja densidad (LDL).

La capacidad antioxidante se puede medir a través del consumo del sustrato, consumo de oxígeno o la concentración de productos intermedios y/o finales. En alimentos las pruebas más comúnmente empleadas son las siguientes (Miguel, 2010):

- Valor de peróxido.
- Especies reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS).
- Contenido de ácidos grasos libres.
- Contenido de polímeros.
- Formación de dienos y trienos conjugados por absorción a 232 y 268 nm.
- Color.
- Composición de ácidos grasos.
- Relación de ácidos grasos insaturados: ácidos grasos saturados.

La mayoría de estas pruebas requieren acelerar las condiciones de oxidación como por ejemplo incrementando la presión parcial del oxígeno y la temperatura del oxígeno, adicionando iones de metales de transición, exponiendo a luz, agitación variable y empleando fuentes de radicales libres.

Entre las técnicas de medición del grado de oxidación de un alimento se destacan dos que, por sus costos reducidos en materiales y reactivos, facilidad de implementación y buenos resultados, se emplean de manera común, estos son la medición de dienos conjugados a través de espectroscopia UV y TBARS (Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico)

Dienos conjugados

En 1933 se descubrió que la formación de dienos conjugados en aceites origina un pico de absorción en el intervalo de 230 – 235 nm en la región ultravioleta. En la década de los años sesenta del siglo pasado, la monitorización de la formación de dienos conjugados a través de espectroscopia ultravioleta se convirtió en una técnica útil para el estudio de la oxidación de lípidos tanto en alimentos como en otros sustratos biológicos (Bailey & Shahidi, 2005).

Durante la formación de hidroperóxidos a partir de ácidos grasos insaturados se generan dienos conjugados debido a la reorganización de los dobles enlaces presentes en la molécula, presentando una fuerte absorción a 234 nm y similarmente los trienos conjugados absorben a 268 nm. Un aumento en la absorción de radiación UV teóricamente releja la formación de productos primarios de oxidación en aceites y se han encontrado buenas correlaciones entre la medición de dienos conjugados y el valor de peróxido.

La implementación de esta técnica de medición del avance de oxidación en aceites y grasas es sencilla, rápida y no requiere de reactivos y solo se requiere de pequeñas muestras de aceite, sin embargo, los resultados obtenidos pueden ser afectados por la presencia de compuestos que absorban en la misma región como es el caso de los carotenoides. Para evitar dichas interferencias, un método alternativo es la medición de productos conjugables. En dicha técnica los hidroperóxidos y algunos otros productos de oxidación son convertidos en compuestos cromóforos a través de reducción y subsecuente deshidratación y posteriormente la concentración de los trienos y tetraenos conjugados es determinada por su absorción a 268 nm y 301 nm respectivamente.

Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

La prueba del ácido tiobarbitúrico fue propuesto hace más de 40 años y en la actualidad es uno de los métodos más ampliamente usados para detectar el deterioro oxidativo de alimentos con contenido graso. Durante la oxidación lipídica, el malonaldehído, que es un

componente minoritario de los ácidos grasos con 3 o más dobles enlaces, se forma como resultado de la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados y es usado como indicador del inicio del proceso de oxidación de lípidos. Para poder cuantificar la presencia de malonaldehído, este se hace reaccionar con ácido tiobarbitúrico y como resultado de esta reacción se forma un complejo malonaldehído – ácido tiobarbitúrico rosado que se puede medir espectrofotométricamente en el rango de 530 – 535 nm (Figura 3)

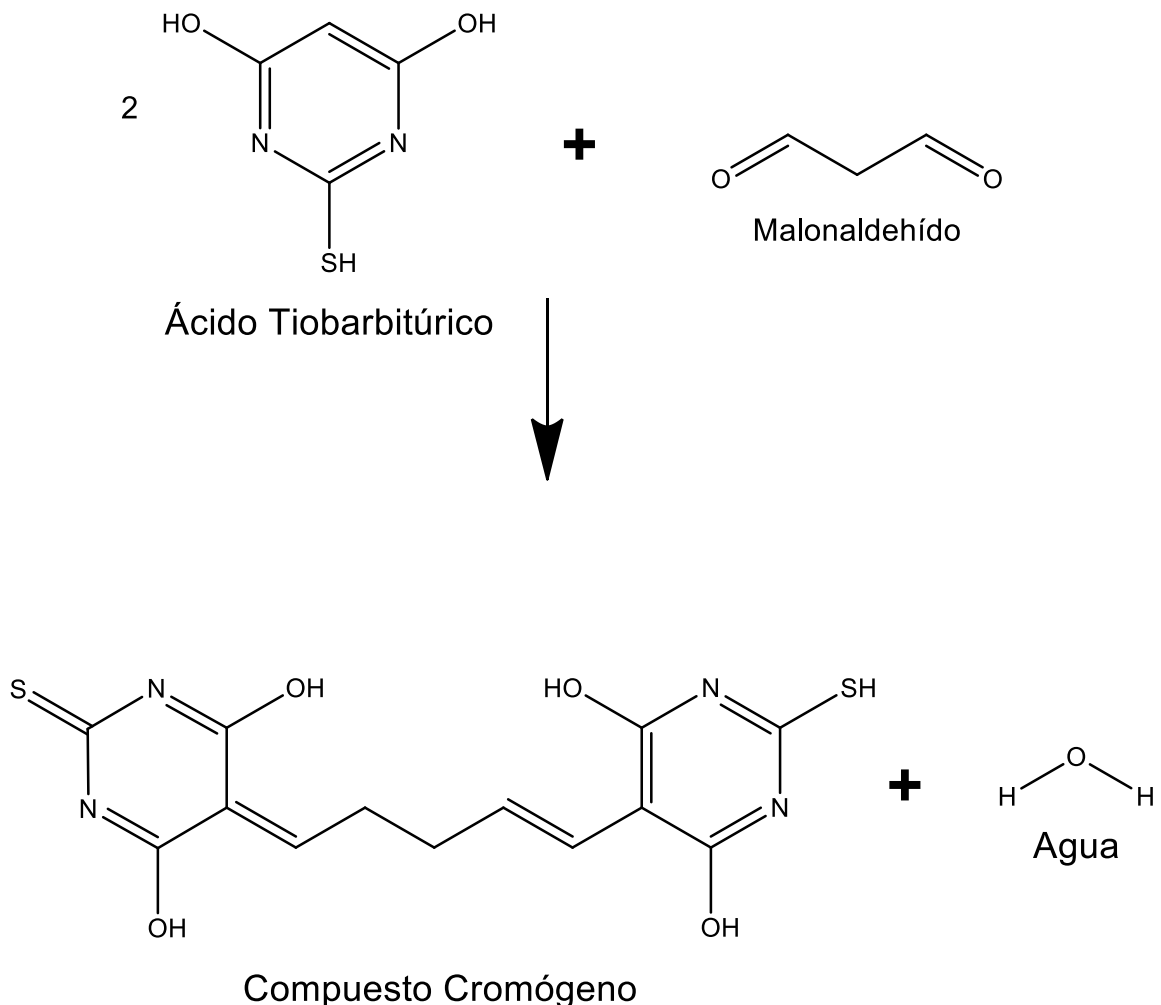


Figura 3. Esquema de reacción del ácido tiobarbitúrico con malonaldehído

Sin embargo, no solo el malonaldehído reacciona con este ácido para formar compuestos cromóforos, sino también otros productos secundarios de oxidación reaccionan con el ácido tiobarbitúrico como lo son alquenes y alcadienos entre otros, originando compuestos de color ligeramente amarillo y que son detectables en el mismo rango espectrofotométrico y de ahí el término de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico para

abarcar todos los productos secundarios que pueden ser cuantificados a través de esta técnica (Kamal-Eldin & Pokorný, 2005).

5.2 Plantas aromáticas y especias

Las hierbas aromáticas y especias juegan un papel importante en la vida diaria de la sociedad como importantes agentes saborizantes y aromatizantes en alimentos, bebidas y productos farmacéuticos, además como ingredientes en perfumes y cosméticos. Los productores de alimentos, bebidas, cosméticos y farmacéuticos están respondiendo a la creciente resistencia de los consumidores y las limitaciones legales impuestas a los productos que contengan aditivos químicos artificiales. Las hierbas y especias como fuentes de colores naturales y saborizantes tienen una gran oportunidad en el mercado internacional. Las propiedades nutricionales, antioxidantes, antimicrobianas y medicinales también tienen un amplio campo de aplicación (Peter, 2006).

Muchas plantas contienen aceites esenciales, sin embargo, diferentes partes de las plantas pueden ser fuente de aceites esenciales con distintas composiciones y propiedades. Entre las partes de las plantas comúnmente explotadas son raíces, pieles de frutos, hojas, semillas, frutos y corteza entre otros. Los aceites esenciales contienen compuestos odoríficos volátiles que son producto del metabolismo secundario de la planta en cuestión. Son mezclas complejas de sustancias que pertenecen a distintas familias químicas, como por ejemplo terpenos, alcoholes, aldehídos, compuestos fenólicos, ésteres, éteres y cetonas (Miguel, 2010).

Los compuestos más comunes en los aceites esenciales de plantas y hierbas aromáticas, divididos por familias químicas, se pueden mencionar entre otros los siguientes:

- Fenoles: timol, eugenol, carvacrol, cavicol
- Alcoholes monoterpenicos: borneol, isopulegol, lavandulol, α -terpineol
- Alcoholes sesquiterpenicos: elemol, nerolidol, santalol, α -santalol
- Aldehídos: citral, mirtenal, cuminaldehído, citronelal, cinamaldehído, benzaldehído
- Cetonas: carvona, mentona, pulegona, fenchona, alcanfor, tujona, verbenona
- Ésteres: acetato de bomilo, acetato de linalilo, acetato de cetronelilo, acetato de geranilo
- Óxidos: 1,8-cineol, óxido de bisabolona, óxido de linalol, óxido de esclareol

- Lactonas: bergapteno, nepelactona, psoraleno, aesculatina, citropteno
- Éteres: 1,8-cineol, anetole, elemicina, miristicina

En la Figura 4 se pueden observar la estructura química de algunos de los compuestos más comunes en los aceites esenciales de hierbas aromáticas.

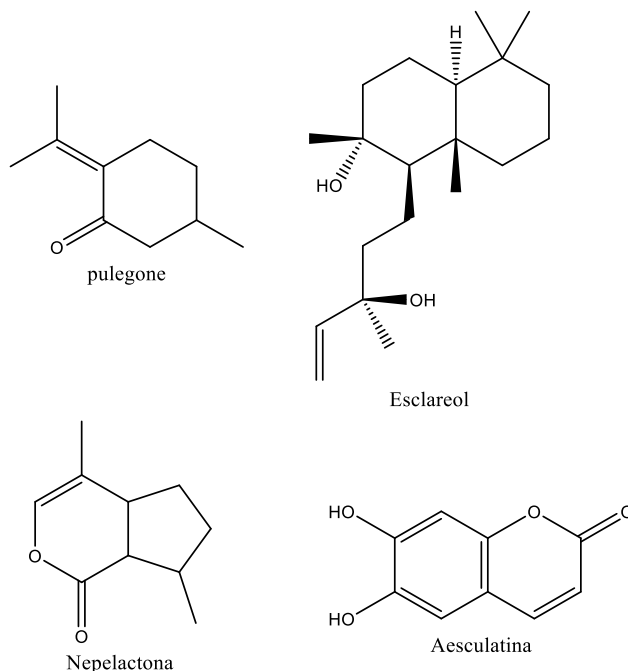


Figura 4. Algunos de los compuestos presentes en aceites esenciales.

5.2.1 Métodos de obtención de aceites esenciales y extractos de plantas aromáticas

Los aceites esenciales pueden ser obtenidos a través de diversos métodos (Tongnuanchan & Benjakul, 2014), sin embargo, el método empleado puede ser determinante para la calidad y composición del aceite esencial a obtener, más aun, algunos autores afirman que solo se puede hablar de aceite esencial al producto de la extracción a través de arrastre con vapor.

La destilación o extracción con arrastre con vapor es uno de los métodos más ampliamente usados para la extracción de aceite esencial de plantas (Reverchon & Senatore, 1992). Generalmente se logra separar un 93% del aceite esencial contenido en la planta a través de esta técnica (Masango, 2005), consistente en poner en contacto el material vegetal con

vapor de agua. El calor aplicado es el principal factor de ruptura de las células vegetales, que genera la liberación de los componentes de los aceites esenciales y estos son arrastrados por el mismo vapor. Esta mezcla vapor – compuestos orgánicos es conducido a un sistema de condensación, y posteriormente a un separador, donde por diferencia de solubilidades y densidades se obtiene el aceite esencial, generalmente como fase ligera, y el agua de destilación, la cual se encuentra saturada en compuestos polares, recibiendo el nombre de hidrosol.

Otra de las técnicas de obtención de aceites esenciales o extractos es la hidrodestilación. Esta técnica se ha vuelto el método estándar para la extracción de materiales vegetales como maderas o flores. También se puede emplear en la extracción de componentes insolubles en agua y de alto punto de ebullición. El proceso consiste en la inmersión completa del material vegetal a extraer en agua, y posterior calentamiento del sistema hasta ebullición del solvente. Este método protege el aceite a extraer hasta cierto grado debido a que el agua circundante actúa como barrera para prevenir el sobrecalentamiento del material. Al igual que la técnica de arrastre con vapor, la mezcla vapor de agua – extracto es condensada y posteriormente separada por decantación. Dependiendo de la configuración del sistema de extracción, el agua o hidrosol obtenido puede ser recirculado al sistema de extracción, aumentando así el rendimiento de extracción del sistema, haciéndolo una buena alternativa para la obtención de extractos a partir de materias primas con bajo contenido de compuestos de interés.

Diversos autores han realizado comparaciones sobre la calidad y composición del aceite esencial obtenido por los dos métodos anteriormente mencionados, un ejemplo de importancia es el estudio realizado por Yildirim, Cakir et al. (2004) en *Teucrium orientale* L. donde se mostró que, empleando la técnica de DPPH como parámetro para evaluar la capacidad de eliminación de radicales, los aceites esenciales obtenidos a través de destilación de vapor tenían mayor actividad antioxidante que sus similares obtenidos a través de hidrodestilación.

Otra de las técnicas empleadas tanto a nivel industrial como en laboratorio es la extracción con solvente, el cual es empleado para la obtención de extractos delicados a partir de materias primas como flores y que no pueden ser obtenidos a través de técnicas como arrastre con vapor o hidrodestilación. Entre los solventes empleados incluyen hexano, acetona, éter de petróleo, metanol y etanol (Koşar, Dorman, & Hiltunen, 2005). Esta técnica

consiste en mezclar el material vegetal con el solvente y posteriormente calentar el conjunto para mejorar la extracción, seguido subsecuentemente de la filtración del material vegetal y la concentración del extracto a través de la evaporación del solvente. El concentrado puede recibir los nombres de resina (o resinoide) o concreto (mezcla de grasas vegetales, compuestos volátiles y aceite esencial. El concreto puede ser mezclado con alcohol puro para extraer el aceite esencial y posteriormente destilado a bajas temperaturas, dando origen al llamado aceite absoluto aromático. La principal desventaja de esta técnica es que es un método largo y por lo tanto el producto obtenido tiene un costo asociado mayor, la ventaja es que se obtiene un producto libre de transgresiones térmicas (Wang, Ding et al., 2006).

Algunos autores han empleado esta técnica en la obtención de extractos con capacidad antioxidante de materiales vegetales como *Ptychotis verticillata* originaria de Marruecos (El Ouariachi, Tomi et al., 2011). En este estudio se determinó que el extracto obtenido era rico en compuestos fenólicos con carvacrol (44.6%) y timol (3,4%) como los principales constituyentes. Igualmente se han estudiado variedades de tomillo como *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *Skorpilii* (TPS) encontrándose que los principales constituyentes del extracto de esta variedad son timol y o-cimeno (Ozen, Demirtas, & Aksit, 2011). Con respecto a la capacidad antioxidante de estos extractos, fueron satisfactorios con respecto a su capacidad de eliminar radicales libres, sin embargo, este procedimiento tiene el inconveniente que puede dejar residuos de solvente en el producto final, lo cual puede generar alergias, toxicidad del producto y afectar el sistema inmune del consumidor (Ferhat, Tigrine-Kordjani, Chemat, Meklati, & Chemat, 2007)

Para la obtención de aceites esenciales y extractos también se han empleados técnicas contemporáneas como la extracción asistida por microondas y la extracción con fluidos supercríticos.

La extracción asistida por microondas tiene como objetivo disminuir la resistencia a la extracción que ejerce las estructuras celulares de la planta a través de la aplicación de radiación en forma de microondas. Esta se puede emplear como pretratamiento de la materia prima o como agente de extracción directamente en el proceso. También es opcional el empleo de solvente o realizar la extracción libre de solvente, teniendo múltiples ventajas e inconvenientes cada una de las alternativas (Lucchesi, Chemat, & Smadja, 2004).

La extracción a través de fluidos supercríticos emplea la capacidad de solvatación que posee una sustancia cuando se lleva a condiciones por encima de su punto crítico de presión y temperatura. Por encima de estas condiciones, los fluidos supercríticos exhiben propiedades de solvatación similares a las de un líquido y propiedades de transporte de un gas, haciéndolo ideal para realizar extracciones, pues no posee las limitantes de viscosidad y tensión superficial que poseen los líquidos y la baja solubilidad de los gases (Gupta, 2007). Otra de las grandes ventajas que posee esta técnica es que, según el diseño del sistema de extracción, se puede considerar como un proceso de extracción – separación en la misma etapa pues, para retirar el solvente, basta con disminuir la presión del sistema (Kim & Hong, 1999). Al despresurizar el sistema la sustancia empleada como solvente retorna a fase gaseosa y deja libre el extracto deseado.

A pesar de las bondades brindadas por técnicas contemporáneas para la extracción de metabolitos de interés a partir de hierbas aromáticas, su implementación a nivel industrial y artesanal es limitada debido a las consideraciones técnicas necesarias y en este punto, la extracción clásica con arrastre con vapor se constituye la técnica más confiable y fácil de implementar como lo ha demostrado diversas experiencias alrededor del mundo desde hace varios siglos (Baser, 2010)

5.2.2 *Mentha spicata* L

La menta es un miembro de la familia de las Lamiaceae, del orden de las Lamiales junto con otras familias como las Verbenaceae, Scrophulariaceae y Acanthaceae. La especie *Mentha spicata* L. es cultivada a lo largo del mundo y es una de las especies con más polimorfismo del reino vegetal (Shimizu, 1962). Entre las especies y subespecies se encuentra un amplio abanico de compuestos fitoquímicos que se pueden obtener en el aceite esencial con proporciones altamente variables dependiendo de la ubicación geográfica y condiciones de cultivo.

La *Mentha spicata* L. ha sido conocida durante siglos por sus propiedades curativas y se cree que los primeros cultivos domésticos fueron realizados en conventos y monasterios en Europa en el siglo IX. Además de sus usos medicinales, en el siglo XVIII se volvió popular su uso culinario.

En términos generales se puede considerar que el compuesto principal que se encuentra en el aceite esencial de *Mentha spicata* es la carvona con cerca del 66%, otros

componentes menores que se pueden encontrar son (-) – Limoneno, 1,8 cineol, linalol entre otros (tabla 1), las estructuras de algunos de ellos se pueden observar en la Figura 5. Todos los compuestos mencionados anteriormente comparten características cercanas. A presión atmosférica normal, ebulen junto a agua en el rango de 99.4°C y 99.6°, tienen calores de vaporización entre 85.3 y 88.0 cal/g. El aceite esencial proveniente de variedades de menta se considera “superficial” debido a que son secretados enteramente en la superficie de las hojas y los tricomas se pueden observar empleando una lupa de baja capacidad de aumento.

Tabla 1. Otros compuestos reportados en *Mentha spicata* L

Compuesto	% (Min - Max)	Compuesto	% (Min - Max)	Compuesto	% (Min - Max)
Isovaleraldehído	0 - 0,1	p-cimeno	0-0,4	hidrato de <i>cis</i> -sabineno	0-0,1
Alfa pineno	0,2 0,9	terpinoleno	0-0,4	beta-cariofileno	0-1,9
alfa tujeno	0 - 0,7	acetato de 3 octilo	0-0,4	terpinen-4-ol	0-1,4
<i>trans</i> - 2,5 - dietiltetrahidrofurano	o - 0,1	(Z)-3-hexenol	0-0,1	<i>cis</i> -dihidricarvona	0-2,5
beta pineno	0,7 - 0.8	3-octanol	0-1,5	carvomentona	0-1,9
sabineno	0 - 0,5	1-octen-3-ol	0-0,9	<i>trans</i> -dehidrocarvona	0-0,2
mirreno	1,5 - 4,4	mentona	0-1,2	gama-muuroleno	0-0,4
alfa terpineno	0 - 0,2	hidrato de <i>trans</i> -sabineno	0,4 - 2,2	(E)- <i>beta</i> - <i>farneseno</i>	0-0,7

La cantidad de aceite esencial en una planta aromática es variable y depende de las condiciones de cultivo, método de secado y extracción, pero se puede considerar como base un contenido de aceite esencial de *Mentha spicata* L. de 0,15L por 100 kg de material vegetal seco (Baser, 2010).

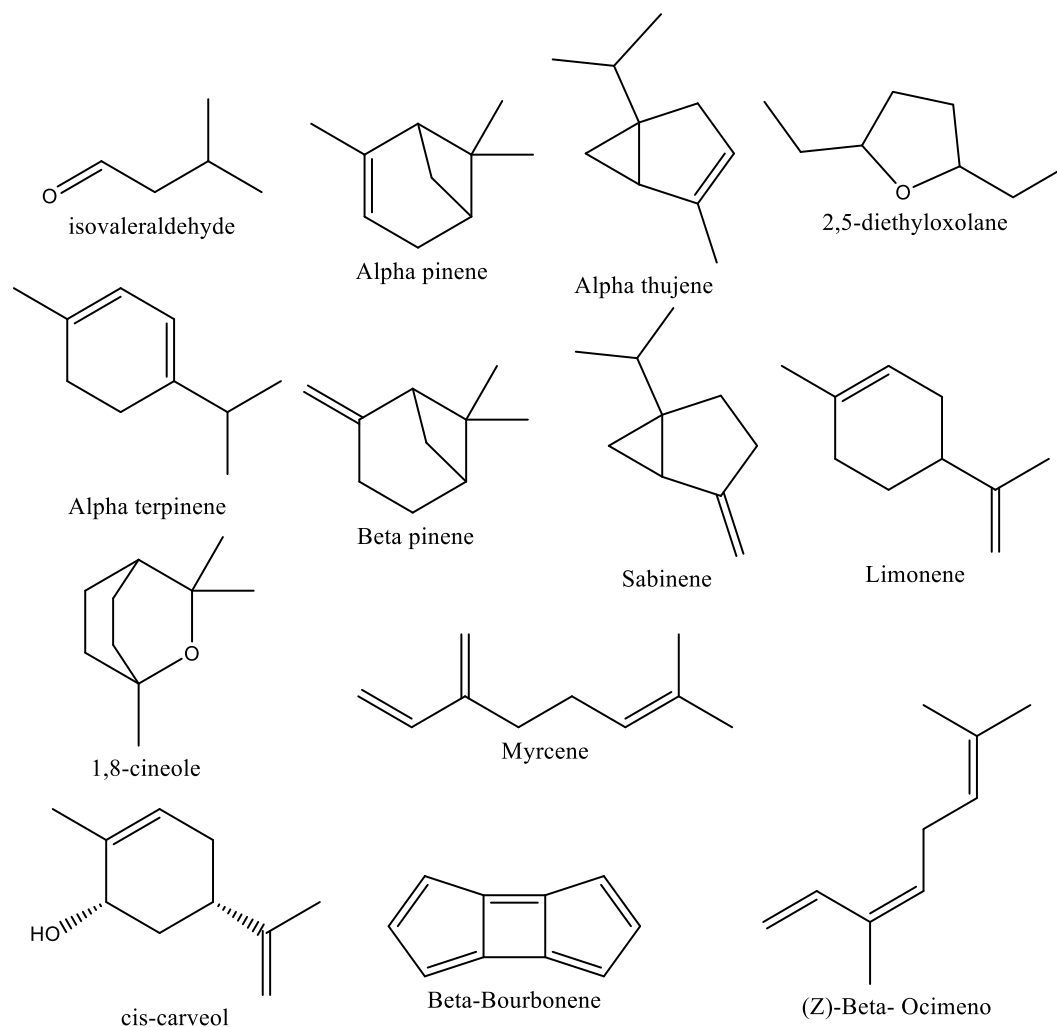


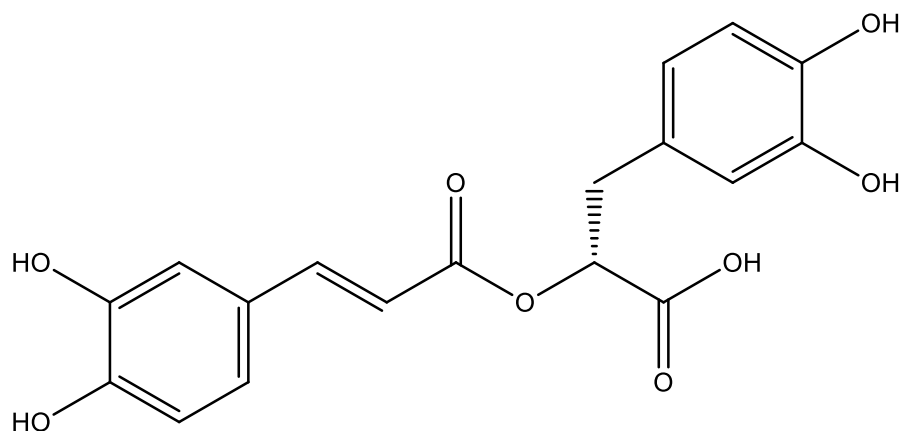
Figura 5. Estructura de algunos de los compuestos reportados en *Mentha spicata* L

La destilación con arrastre de vapor puede recuperar los aceites volátiles de muchas de las especies del genero *Mentha*. Existen 4 especies de interés comercial alrededor del mundo; *Mentha piperita*, cuyo aceite esencial es 75% una mezcla de mentol y mentona en proporciones de 2:1 o 3:1 respectivamente. *Mentha canadensis*, el cual se considera la mejor fuente natural de mentol con una composición cercana del 70%. *Mentha spicata* y *Mentha gracilis*, conocidas popularmente como hierbabuena nativa y escocesa, sus aceites esenciales están compuestas por cerca de 66% de carvona y por ultimo esta la *Mentha pulegium* o Menta poleo, con más de 90% de pulegona.

La mayoría de la producción de extractos y aceites esenciales de menta se obtiene a través de destilación con arrastre con vapor o hidrodestilación, lo que facilita el empleo de estos en industrias cosmética y alimenticia.

5.2.3 *Thymus vulgaris* L

Dentro de la familia Labiada, con cerca de 220 géneros, el género *Thymus* es uno de los 8 más importantes con respecto al número de especies incluidas. En inglés, la palabra “thyme” es usada indistintamente para el género y para la especia más conocida y comerciada, tomillo. En términos generales, el tomillo es una planta aromática usada en medicina y propósitos culinarios en casi todo el globo. Este género es común en el mediterráneo, donde algunas especies forman un tipo especial de vegetación tipo arbusto de 50 cm de alto con buena adaptación a las condiciones cálidas y secas del verano (Stahl-Biskup & Venskutonis, 2012).



Ácido rosmarínico

Figura 6. Estructura del ácido rosmarínico

La composición del aceite esencial del género *Thymus* ha sido investigado en los últimos 30 años y han sido identificado cerca de 360 compuestos volátiles diferentes. El 75% de los compuestos identificados pertenecen a la familia de los terpenos, siendo los monoterpenos los más importantes (43%), seguidos por los sesquiterpenos (32%). Junto a los terpenos, un pequeño grupo de alifatos no terpenoides (17%) aparecen en muchos aceites esenciales, pero en muy bajas concentraciones. Los derivados simples del benceno se encuentran presentes en cerca del 6% y los fenilpropanoides, con un 2%, se encuentran muy esporádicamente (Lahlou, 2004). El aceite esencial se obtiene por el método tradicional de destilación con vapor con un rendimiento reportado de en promedio 0,20 litros de aceite esencial por 100 kg de material seco (Stahl-Biskup & Venskutonis, 2012). Los compuestos más representativos son timol, carvacrol, linalol, p-cimeno, gamma-terpineno, borneol, 1,8 cineol, geraniol, acetato de alfa terpinilo en distintas

concentraciones que dependen de la especie analizada y de las condiciones estudiadas. En *Thymus vulgaris* se pueden encontrar cerca de 25 flavonoides diferentes, de los cuales los más importantes son apigenina y luteolina. Estos son acompañados por una gran cantidad de flavonas metiladas las cuales pueden ser empleadas como marcadores químicos sistemáticos del género *Thymus*, encontrándose solamente en ciertos grupos taxonómicos (Peter, 2004a).

Aparte del aceite esencial, los taninos contribuyen a su uso comercial. Los taninos están representados principalmente por el ácido rosmarínico, homólogo del ácido cafeico y dehidrocafeico (Figura 6), el contenido de ácido rosmarínico pueden variar entre 0.15 a 2,6%. También se han reportado ácidos fenólicos libres como por ejemplo ácido cafeico, ácido p-cumárico, siríngico y ferúlico.

5.2.4 *Rosmarinus officinalis* L

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.), de la familia Lamiaceae, es una hierba aromática perenne, de tallo duro, densa y siempre verde de 90 a 200 cm de altura con hojas pequeñas. La superficie superior de la hoja es verde oscuro mientras el envés tiende a ser blanco. Pequeñas flores azules aparecen en inflorescencias cimosas. Tanto las hojas como flores y ramificaciones son susceptibles de ser tratadas para obtener aceite esencial y oleorresina de gran valor en la medicina tradicional y moderna, así como en aromaterapia y en industrias como la cosmética y de sabores. Además de estos usos también son valorados como alimento funcional debido a su capacidad antioxidante y repelente de insectos.

El romero es una planta nativa de la región del mediterráneo, numerosos cultivos y formas salvajes identificados por quimotipos se encuentran distribuidos en países de esta parte del mundo. El *Rosmarinus officinalis* se emplea comúnmente para la obtención de aceite esencial, sin embargo, en Marruecos también se emplea el *Rosmarinus eriocalyx* (Peter, 2004b).

La composición del aceite de romero esta tradicionalmente constituido por 1,8-cineol (30-40%), alcanfor (15-25%), borneol (16-20%), acetato de bornilo (más de 7%), alfa pineno (25%). Otros compuestos reportados se encuentran beta-pineno, linalol, canfeno, subineno, mirceno, alfa felandreno, alfa terpineno, limoneno, p-cimeno, terpinoleno, thujeno, copaleno, terpinen-4-ol, alfa terpineol, cariofileno, metil cavicol, timol. Las

primeras fracciones de destilación contienen principalmente alfa thujeno, alfa pineno, canfeno, beta pineno y 1,8-cineol, mientras que el alcanfor y acetato de bornilo constituyen el cuerpo de la destilación (Rao, 1999).

El aceite de romero exhibe una variación en composición, tanto en su perfil como en la concentración de los distintos compuestos con respecto a la localización y otros factores como la población y fenología (Guazzi, Maccioni et al., 2001). Se han reportado un total de 58 compuestos en aceites esenciales de romero proveniente de Sardinia y Córcega basados en estudios empleando índice de retención en cromatografía de gases, GC-MS y C-NMR.

El aceite de romero es usualmente obtenido a través de destilación con vapor con un rendimiento reportado de cerca de 0,62 litros por 100 kg de materia seca. Cerca del 90% del aceite se extrae en los primeros 60 minutos de destilación, y después de 120 minutos se obtiene recuperación total bajo condiciones de destilación de campo. El aceite que se obtiene a partir de las hojas y flores es de mejor calidad que el obtenido de la planta entera. Si se compara la destilación con arrastre con vapor y la hidrodestilación se puede determinar que con la primera se obtiene un aceite de mejor calidad.

El contenido de aceite en las hojas frescas de romero es cerca del 1% y éste se incrementa a 3% en hojas secas. A partir de una hectárea de cultivo se pueden cultivar cerca de 10 a 12 toneladas de hierba por año obteniéndose entre 25 a 100 kg de aceite esencial (Farooqi, 2001).

5.3 Producción de plantas aromáticas en Colombia

La producción de plantas aromáticas en Colombia es una industria diversa y que presenta grandes dificultades debido a la turbulencia e incertidumbre del mismo (Alvarez, 2011). A pesar que se ha reportado un crecimiento en la industria de plantas aromáticas en el país, no existen cifras exactas sobre la el nivel de producción de cada una de las plantas aromáticas debido a que el cultivo de estas sigue siendo rustico y pequeño, circunscritos a parcelas familiares y sin alto grado de tecnificación (Castro Restrepo, 2013)

La producción de plantas aromáticas ha tenido una tendencia creciente a partir del año 2007 según datos reportados de Agronet (Ministerio de Agricultura, 2016), quien recoge datos estadísticos a partir de estudios realizados por gobernaciones y municipios, lo que

genera que la fuente de datos no sea homogénea y que existan años con datos faltantes sin que implique ausencia de cultivo en dicho año.

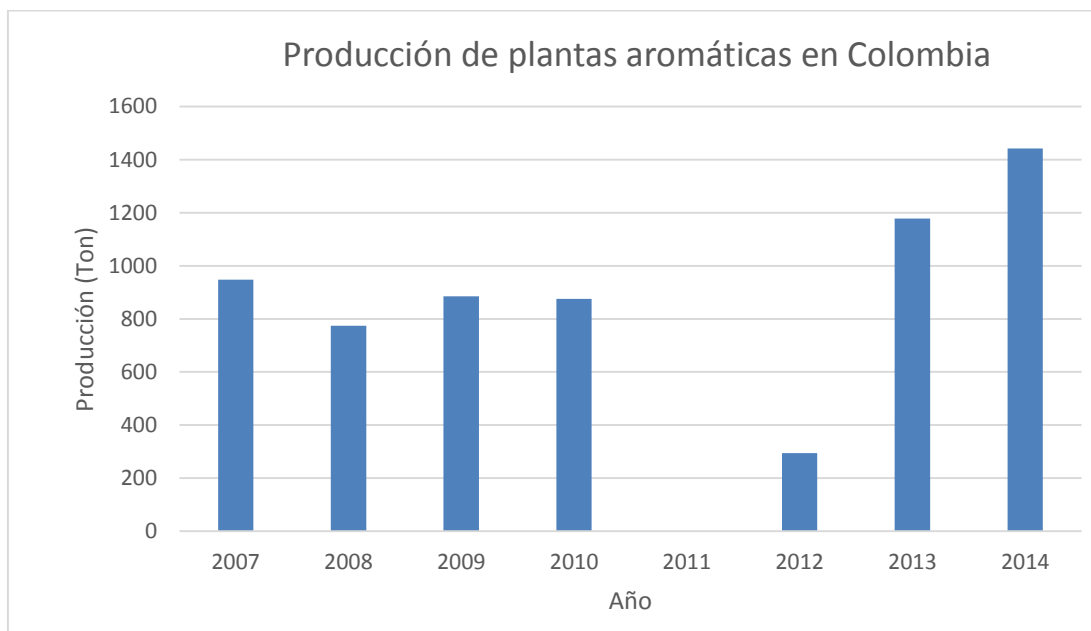


Figura 7. Datos de producción de plantas aromáticas en Colombia (2007 – 2014)

Para el caso de las tres especies de plantas aromáticas de estudio, se presentan datos variables debido a lo mencionado con anterioridad. En el caso de *Rosmarinus officinalis* el único dato obtenido corresponde al año 2012 donde se reporta una producción de 50,48 toneladas. Para *Mentha spicata*, los valores encontrados no reportan si diferencia entre el cultivo de yerbabuena (*Mentha spicata*) o algunas otras especies del genero *Mentha* que se cultivan en el país, reportando un nivel de producción de 484 toneladas para el año 2014. Los datos para *Thymus vulgaris* son más amplios, con registros desde el año 2008 que indicarían una caída en la producción de esta planta aromática desde 36 toneladas en el año 2008 a 5,2 toneladas reportadas en 2014.

Los anteriores datos tienen las mismas limitantes que se mencionaron párrafos atrás, así que solo permiten tener una idea vaga sobre el estado de cultivo de estas tres plantas aromáticas. Las empresas que producen y comercializan plantas aromáticas para consumo humano en infusiones son reservadas con sus valores de producción (Alvarez, 2011), por lo tanto el cultivo de estas y otras especies puede ser mayor con referencia a los datos encontrados en el portal gubernamental.

5.4 Elicitores en plantas

Se entiende por elicitador una sustancia o estímulo que son empleados en pequeñas concentraciones en células vivas para producir mejoras en la biosíntesis de compuestos específicos (R. Radman, T. Saez, C. Bucke, & T. Keshavarz, 2003). Los elicitores pueden clasificarse con base a su naturaleza en elicitores bióticos y abióticos, o en base a su origen en exógenos y endógenos.

Los elicitores abióticos son sustancias de origen no biológico, principalmente sales inorgánicas de cobre, cadmio y calcio en solución con pH altos o factores físicos como radiación UV, estrés mecánico y cambios abruptos de temperatura alta o baja. Similarmente los elicitores bióticos son sustancias de origen biológico como polisacáridos provenientes de la pared celular y microorganismos.

Por otra parte, los elicitores exógenos son sustancias originadas fuera de las células vegetales como poliaminas y ácidos grasos, mientras que los elicitores endógenos son originados en el interior de la célula como galacturonidos o hepta-beta-glucósidos (Namdeo, 2007).

Para que la acción de un elicitador sea eficaz se deben tener en cuenta parámetros tales como la dosis del elicitador, el tiempo de exposición y el mecanismo de exposición. Una dosis baja puede no generar cambio o efecto alguno en el metabolismo, en cambio una dosis elevada puede acarrear la muerte del tejido.

5.4.1 Radiación UV-B como elicitador fitoquímico

Se entiende por elicitador una sustancia o estímulo empleado en pequeñas concentraciones en células vivas para producir mejoras en la biosíntesis de compuestos específicos (Romeo Radman, Teresa Saez, Christopher Bucke, & Tajalli Keshavarz, 2003). Los elicitores pueden clasificarse según su naturaleza en elicitores bióticos y abióticos, o según su origen en exógenos y endógenos (Namdeo, 2007).

Los elicitores abióticos son sustancias de origen no biológico, principalmente sales inorgánicas de cobre, cadmio y calcio en solución con pH altos o factores físicos como radiación UV, estrés mecánico y cambios abruptos de temperatura alta o baja. Los

elicitores bióticos son sustancias de origen biológico como polisacáridos provenientes de la pared celular y microorganismos. Por otra parte, los elicitores exógenos son sustancias originadas fuera de las células vegetales como poliaminas y ácidos grasos, mientras que los elicitores endógenos son originados en el interior de la célula como galacturonidos o hepta-beta-glucósidos (Namdeo, 2007).

Para que la acción de un elicitador sea eficaz se deben tener en cuenta parámetros tales como la dosis del elicitador, el tiempo de exposición y el mecanismo de exposición. Una dosis baja puede no generar cambio o efecto alguno en el metabolismo, en cambio una dosis elevada puede acarrear la muerte del tejido (Cisneros-Zevallos, 2003).

El uso de elicitores en plantas ha sido objeto de estudio en las últimas décadas y se ha aplicado a varios campos de investigación como en aumentar el rendimiento de una sustancia objetivo, la investigación sobre la regulación del metabolismo secundario y su enzimología, estimulación de sistemas defensivos del tejido vegetal y aumento en la calidad global de productos de interés (Veeresham & Kokate, 2004).

La radiación UV se ha empleado como elemento para mantener la calidad y extender la vida útil de muchos frutos y vegetales frescos. El rango del espectro en su región ultravioleta se encuentra entre 10 a 400 nm y se puede clasificar en radiación UV-A (315 – 400 nm), UV-B (280 – 315 nm) y UV-C (100-280 nm). Entre más corta sea la longitud de onda en el espectro, la radiación tendrá un mayor contenido energético y a su vez una incidencia mayor en las células, es así como en el caso de radiación UV-C se usa como agente biocida para la esterilización de productos alimenticios (Baysal, Molva, & Unluturk, 2013; Shama, 2007; Yun, Yan, Fan, Gurtler, & Phillips, 2013).

Otro de los aspectos de interés que ha desembocado en el estudio del efecto de un aumento en la cantidad de radiación UV-B que llega a la superficie es los posibles cambios que genere sobre los ecosistemas del planeta. Debido a la disminución de la capa de ozono se han realizado diversos estudios sobre el impacto que genera esta radiación adicional, haciendo especial énfasis en cultivos de importancia económica y agronómica (Szumny, Figiel, Gutiérrez-Ortíz, & Carbonell-Barrachina, 2010).

En comparación a los estudios realizados sobre los mecanismos que rigen las respuestas de las plantas luz azul, roja o roja lejana (infrarroja), la elucidación sobre los mecanismos

asociados a la percepción de radiación UV ha sido lenta y aún quedan muchos interrogantes por resolver (Doymaz, 2011).

Según los estudios realizados por diversos investigadores, se pueden clasificar en cuatro los mecanismos a través de los cuales las plantas responden a la presencia o aumento de radiación UV-B incidente: fotogeneración de especies reactivas del oxígeno (ROS), fotodaño al ADN celular, absorción de radiación en un receptor UV-B específico con un máximo de absorción en el rango de 280 – 290 nm (UVR8) y la absorción de radiación en otro receptor con un máximo de absorción en la región de 300 – 310 nm (Bomgardner, 2014). Estos mecanismos pueden que se presenten o no de manera simultánea en un organismo y tengan efecto sobre las respuestas metabólicas que desencadene la radiación en la planta.

Por otra parte, las respuestas que pueden generar la radiación UV-B en plantas pueden ser tres: 1) Respuesta general a un estrés, lo cual desencadena por parte del metabolismo una respuesta protectora de la planta como si se tratase del ataque de un herbívoro o parásito, aunque algunos investigadores han realizado una diferenciación según las dosis de radiación a las cuales la planta sea expuesta, sugiriendo que a un nivel bajo la radiación UV-B generaría un *eustrés* o estrés positivo (Hideg, Jansen, & Strid, 2013). 2) Los metabolitos secundarios tienen un efecto de filtro solar y protegen las células de la radiación y 3) La radiación ayuda a generar un nivel de diferenciación necesario para la producción de metabolitos secundarios (Doymaz, 2011).

Estas tres clases de respuesta han sido propuestas para explicar porque algunas plantas generan una, dos o las tres respuestas sin que sea necesario la presencia de todas en una misma planta. Por ejemplo, es conocido que la síntesis de flavonoides está fuertemente ligada a la acción de radiación UV-B debido a que enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS) son estimuladas por la radiación UV-B (Shirley, 1996) y estos a su vez están relacionados con actividad fotoprotectora e inhibidora de ROS. En algunas especies se ha determinado un efecto positivo sobre la producción de compuestos de tipo alcaloide que, además de tener capacidad de absorber radiación UV, tienen propiedades tóxicas y disuasorias frente a organismos herbívoros, lo cual lo enmarca en la segunda respuesta (Levin, 1976). Con respecto a la producción de aceites esenciales que en algunas especies se ve estimulada por la presencia de esta clase de radiación, algunos autores señalan la posibilidad que los tricomas que se encuentran en la superficie

de las hojas de la mayoría de plantas aromáticas se vean estimulados por la radiación UV-B y esto explique el porque del aumento en la producción de aceite esencial (Karousou, Grammatikopoulos, Lanaras, Manetas, & Kokkini, 1998), lo cual constituiría un ejemplo del tercer mecanismo de respuesta propuesto.

6. Metodología

La metodología del estudio se dividió en tres etapas principales: 1) Recepción del material, radiación y procesamiento, 2) Extracción de aceites esenciales y 3) Determinación del contenido de fenoles y flavonoides en el material vegetal y análisis de capacidad antioxidante de los aceites esenciales.

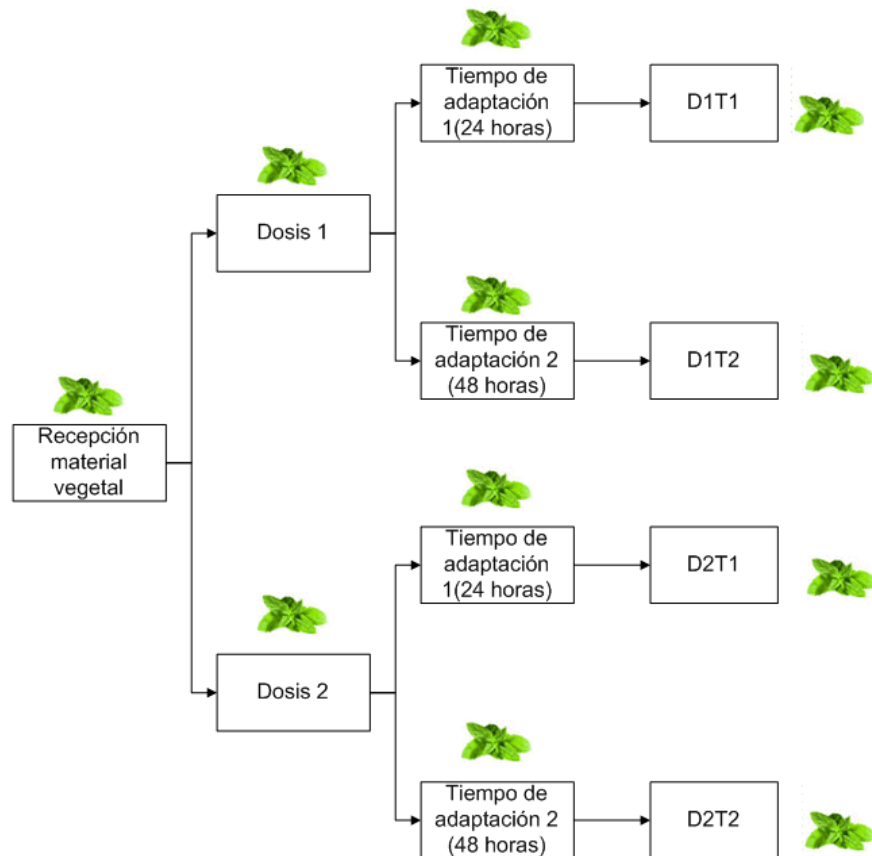


Figura 8. Diseño experimental para la etapa 1 (D=dosis de radiación, D1 =0,05 W. h .m⁻², D2=0,075 W. h .m⁻², T= Tiempo de adaptación)

6.1.1 Recepción del material, radiación y procesamiento

Las muestras de especias aromáticas fueron suministradas por la empresa Kiska S.A. y fueron cultivadas en la zona del municipio del Rosal, ubicado a 20 km de Bogotá (Colombia) (4°51'07"N 74°15'46"O, altitud 2685 msnm).

Las muestras de las plantas aromáticas fueron irradiadas en una cámara de radiación fabricada en laboratorio en el marco de una investigación anterior dentro del grupo de investigación Poscosecha de Productos Agrícolas del Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, provista de dos lámparas de luz ultravioleta TL 40W/12 RS SLV (Koninklijke Philips N.V. Ámsterdam, Holanda). La cantidad de radiación fue monitoreada a través de un radiómetro Delta OHM HD 2102.2 equipado con una sonda LP 471 UVB (Delta Ohm S.r.L. Padova, Italia). El material vegetal fresco se sometió a dos dosis de radiación (0,05 y 0,075 W. h .m⁻²) que se denominaron D1 y D2 respectivamente. Para lograr las dosis mencionadas se someten a tiempos de radiación de 70 y 110 minutos respectivamente según lo reportado en anteriores estudios (Perez, Schreiner et al., 2009)

Posterior al proceso de radiación, el material se almacenó a condiciones ambientales y baja luminosidad para dar tiempo a los tejidos vegetales de reaccionar ante el estímulo. A este tiempo se le denominó "tiempo de adaptación" período necesario para que los tejidos respondan al estímulo al cual fueron sometidos. Los tiempos de adaptación empleados fueron 24 y 48 horas (T1 y T2 respectivamente) (Perez, Schreiner et al., 2009). Estos periodos de tiempo fueron escogidos según experiencias e investigaciones anteriores dentro del grupo de investigación en materiales similares.

La combinación de los dos factores de radiación dio origen a un diseño factorial de 2*2 y cada combinación se realizó por triplicado. Además de los tratamientos, se trabajó un control, que permaneció el mismo tiempo de adaptación que el material tratado.

El secado se realizó en un horno de convección forzada en un intervalo de temperaturas de 40 a 50 °C hasta peso constante y fijación de color en las hojas teniendo en cuenta estudios realizados por diversos autores dependiendo de la planta aromática a secar (Doymaz, 2011; Lebert, Tharrault, Rocha, & Marty-Audouin, 1992; Szumny, Figiel et al., 2010). Posterior a esta etapa se tomó el peso de la muestra seca para su posterior comparación con el peso de la muestra fresca y determinar el cambio en la materia seca.

Para el proceso de molienda se empleó un molino casero de discos con el fin de controlar la velocidad de molienda y la temperatura de las muestras.

6.1.2 Extracción de aceites esenciales

Para la obtención del aceite esencial se empleó la técnica de arrastre con vapor, modificando ligeramente el montaje sugerido por Zubrick a las condiciones ambientales de Bogotá, Colombia (2640 msnm) (Figura 9) (Zubrick, John, & Sons, 2014).

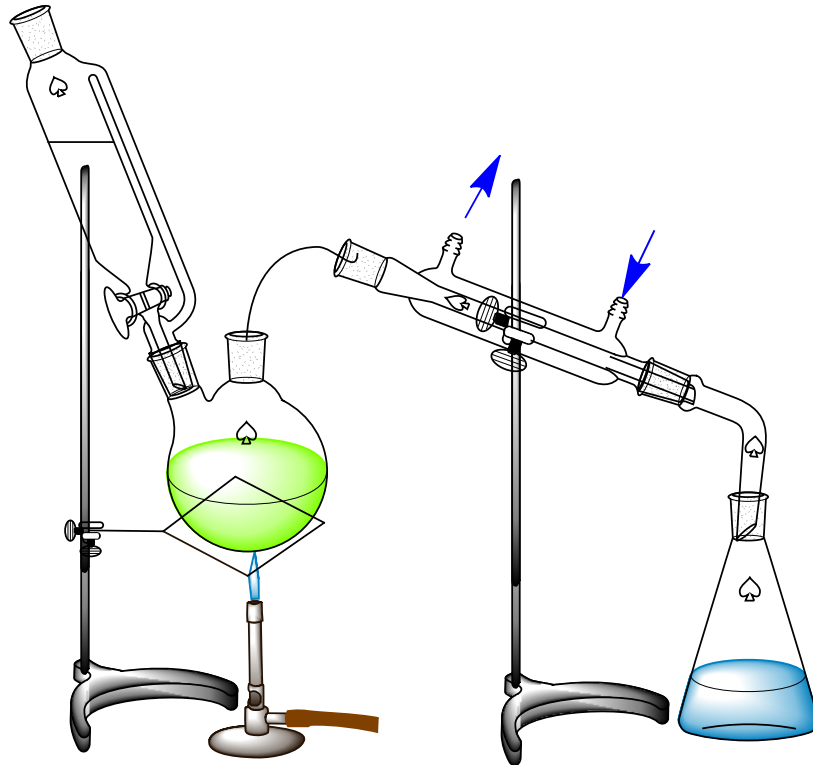


Figura 9. Esquema del montaje de extracción con arrastre con vapor.

La principal modificación que se realizó fue la adición de un cuello de cisne de vidrio al final del montaje con el fin de separar las fases al generar un sifón que permitía al condensado decantarse y permitir la separación del aceite esencial y del hidrosol.



Figura 10. Detalle del cuello de cisne

Para la recolección del aceite esencial se emplearon pipetas Pasteur de vidrio y se secaron empleando sulfato de sodio anhidro (Carlo Erba Reagents Srl, Milano, Italia). Posteriormente, los aceites esenciales se almacenaron en frascos ámbar de vidrio, se etiquetaron y almacenaron en refrigeración.

6.1.3 Determinación del contenido de fenoles y flavonoides en el material vegetal y análisis de capacidad antioxidante de los aceites esenciales.

La determinación de fenoles y flavonoides se llevó a cabo sobre la materia vegetal seca, según los procedimientos que posteriormente se detallan. Para la medición de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales obtenidos, se emplearon como tratamientos o aditivos antioxidantes los aceites obtenidos tanto a partir del material irradiado como de los controles para evaluar el efecto que pudiese tener el tiempo de adaptación en la capacidad antioxidante de dichos aceites.

Todas las extracciones y determinaciones se realizaron por triplicado. Los reactivos empleados en estas determinaciones fueron marca Merck (Merck KGaA, Darmstadt,

Alemania) y la absorbancia fue determinada en un equipo Optizen POP (Mecasys Co., Ltd, Daejeon, Korea) en el laboratorio de poscosecha del Departamento de Ingeniería Agrícola y Civil de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia.

- **Determinación de contenido total de fenoles**

El contenido total de fenoles se determinó empleando el reactivo de Follin Ciocalteu y empleando ácido gálico como estándar (Stankovic, Niciforovic, Topuzovic, & Solujic, 2011; Strycharz & Shetty, 2002). Se tomaron 50,00 mg de material vegetal y se almacenaron en 2,5 ml etanol por espacio de 72 horas a 0°C. Se homogenizaron y centrifugaron las muestras y se tomó una alícuota de 1,0 ml. Posteriormente se adicionaron 5 ml de agua destilada y 1,0 ml de etanol a la alícuota. Se agregaron 0,5 ml de reactivo de Follin – Ciocalteu al 50% v/v y se dejó reaccionar por espacio de 5 minutos. Transcurrido el tiempo se adiciona 1,0 ml de solución de carbonato de sodio anhidro 5% y se homogenizó. Se realizó la medición a 725 nm en celdas de cuarzo.

- **Determinación del contenido de flavonoides**

El contenido total de flavonoides fue determinado espectrofotométricamente empleando el protocolo reportado para usar material vegetal seco o fresco mediante el uso de quercetina como patrón (Sumczynski, Bubelova, Sneyd, Erb-Weber, & Mlcek, 2015). Se extrajeron 50,00 mg de material vegetal con 2,5 ml de etanol por espacio de 72 horas a 0°C. Se homogenizaron y centrifugaron las muestras y posteriormente se tomó una alícuota de 0,85 ml del extracto. Se adicionaron 8,5 ml de etanol al 20% y 0,375 ml de solución de cloruro de aluminio 0.3 M a la alícuota y se deja reaccionar por espacio 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 2,5 ml de hidróxido de sodio 1M. Se almacenó por 10 minutos y se tomó la lectura de la absorbancia a 506 nm.

- **Oxidación de aceites comestibles**

Para medir la eficacia de los aceites esenciales obtenidos en prevenir los procesos de oxidación en aceite vegetal comestible se empleó el método AOCS Cg 5-97 (American Oil Chemists, 2005). En frascos de vidrio color ámbar se colocaron 25,00 gramos de aceite vegetal libre de antioxidantes suministrado por una empresa nacional de alimentos, se emplearon un total de 21 frascos, uno por cada aceite esencial obtenido de cada combinación de radiación – tiempo de adaptación, controles del tratamiento de radiación,

dos antioxidantes comerciales (BHA y BHT) y un control sin ningún tipo de sustancia antioxidante.

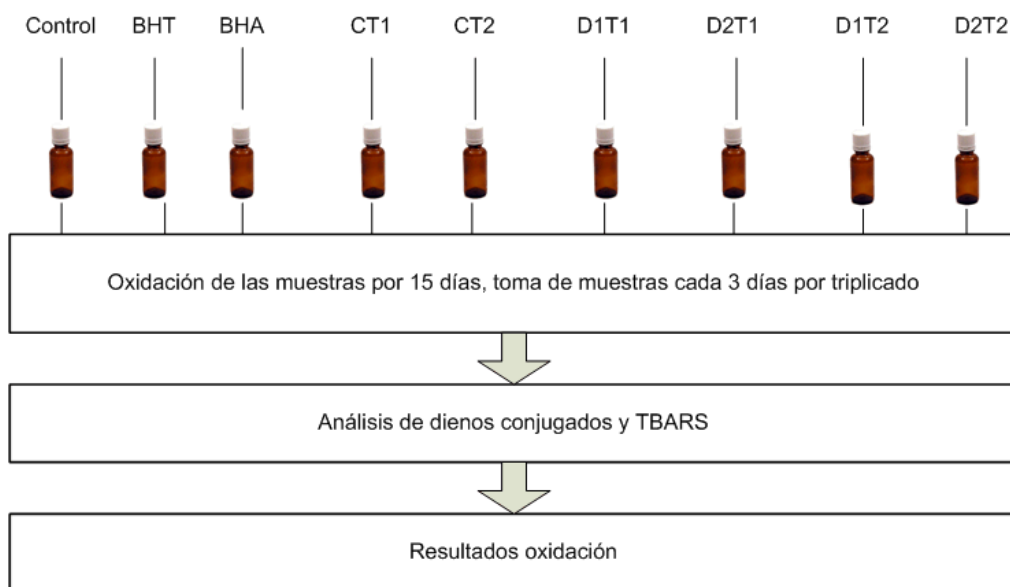


Figura 11. Diseño experimental ensayo de oxidación acelerado en estufa.

El calentamiento se llevó a cabo por espacio de 15 días en un horno de convección forzada Heratherm con control digital de temperatura (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA), tomando muestras por triplicado cada 3 días. Los aceites esenciales provenientes del material irradiado y sus respectivos controles al igual que antioxidantes comerciales se adicionaron a las muestras de aceite hasta obtener una concentración final de 200 ppm según lo recomendado en el Codex Alimentarius (FAO, 2001)

▪ **Medición de dienos conjugados**

Los dienos conjugados son los compuestos primarios principales que se producen en las primeras etapas del proceso de oxidación de lípidos en alimentos debido a la modificación de la ubicación de los dobles enlaces presentes en los esteres de ácidos grasos, que se transforman en dobles enlaces conjugados que pueden ser detectados y cuantificados a través de espectrometría UV. Debido a esta propiedad, es una de las alternativas más sencillas y confiables para monitorizar el proceso de oxidación en sus primeras etapas en aceites comestibles y lípidos.

Para la medición de dienos conjugados en las muestras de aceite se siguieron las recomendaciones y procedimiento expuestos en la literatura (Wrolstad, 2005). Se tomaron

20 µl de cada muestra de aceite en proceso de oxidación y se llevaron a volumen en balones aforados de 25,00 ml con iso-octano, se mezclaron vigorosamente y se midió su absorbancia a 233 nm empleando celdas de cuarzo.

- **Medición de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico es una de las pruebas preferidas por su sencillez y efectividad al cuantificar productos finales de oxidación. Este ensayo nació para cuantificar la cantidad de malondialdehído que se produce en el proceso de oxidación de lípidos, sin embargo, otros productos de tipo carbonilo son capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico y por dicha razón se habla de especies reactivas.

La medición de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico se realizó de acuerdo a la metodología reportada en el método AOCS Cd 19-90 (American Oil Chemists, 2005) según es reportado por Wrolstad (Wrolstad, 2005). En tubos de ensayo con tapa protegidos de la luz solar directa se colocaron 0,10 ml de cada aceite tratado térmicamente tratado, posteriormente se adiciono ácido acético glacial hasta obtener una disolución 1:2. Se adicionaron 2,5 ml de solución de ácido 2 tiobarbitúrico 0,02 M en ácido acético glacial. Los tubos de ensayo tapados se incubaron a 80°C a baño de María por espacio de 45 minutos. Pasado este tiempo se dejaron enfriar por 10 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante otros 10 minutos. Se tomaron 2,0 ml del fondo del tubo y se midió la absorbancia en celdas de cuarzo a 532 nm.

Para poder expresar los resultados en unidades de miligramo (mg) de malondialdehído (MDA) por kilogramo de aceite se realizó una curva de calibración de malondialdehído empleando como precursor tetraetoxipropano según la técnica reportada por Matsushita y colaboradores (Matsushita, Inoue, & Tanaka, 2010).

6.1.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en SPSS Ver. 22 (IBM Corporation, Armonk, New York, U.S.). Para comprobar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro Wilk y dependiendo del resultado obtenido se empleó análisis ANOVA o Kruskal Wallis.

7.Resultados y discusión

Ensayos previos mostraron que los controles respecto al tiempo de adaptación no mostraban diferencias significativas con respecto al control frente a ambos tratamientos, por lo tanto, se obviaron dichos controles en la medición de fenoles y flavonoides, pero si se emplearon sus aceites esenciales en las pruebas de oxidación esto se realizó con el fin de economizar recursos tanto en reactivos como en tiempo de análisis necesario para cada muestra.

7.1 *Mentha spicata* L

7.1.1 Contenido de aceite esencial

La cantidad o contenido de aceite esencial medido con respecto a la cantidad de material seco sometido a extracción se relaciona en la figura 12. La aplicación de radiación UV-B en combinación a tiempos de adaptación genero un efecto positivo sobre la cantidad de aceite esencial que se recuperó a través de destilación con arrastre con vapor. El mayor impacto lo generó la combinación de tratamientos D2T2 con un rendimiento de 0,024 %, lo cual representa un aumento de 18 puntos porcentuales con respecto al aceite esencial obtenido de la muestra control (ver Figura 12).

Los tratamientos D1T1, D1T2 y D2T1 no mostraron diferencias significativas entre sí, sin embargo, si existe diferencia entre ellos y el tratamiento control. Las diferencias entre el control y las muestras sometidas a radiación puede deberse a la estimulación de la PAL en la ruta de síntesis de los fenilpropanoides por parte de la radiación UV-B, la cual ha sido reportado en diversos estudios como uno de los posibles efectos esperados al aplicar esta clase de radiación (Barnes, Jordan, Gold, Flint, & Caldwell, 1988).

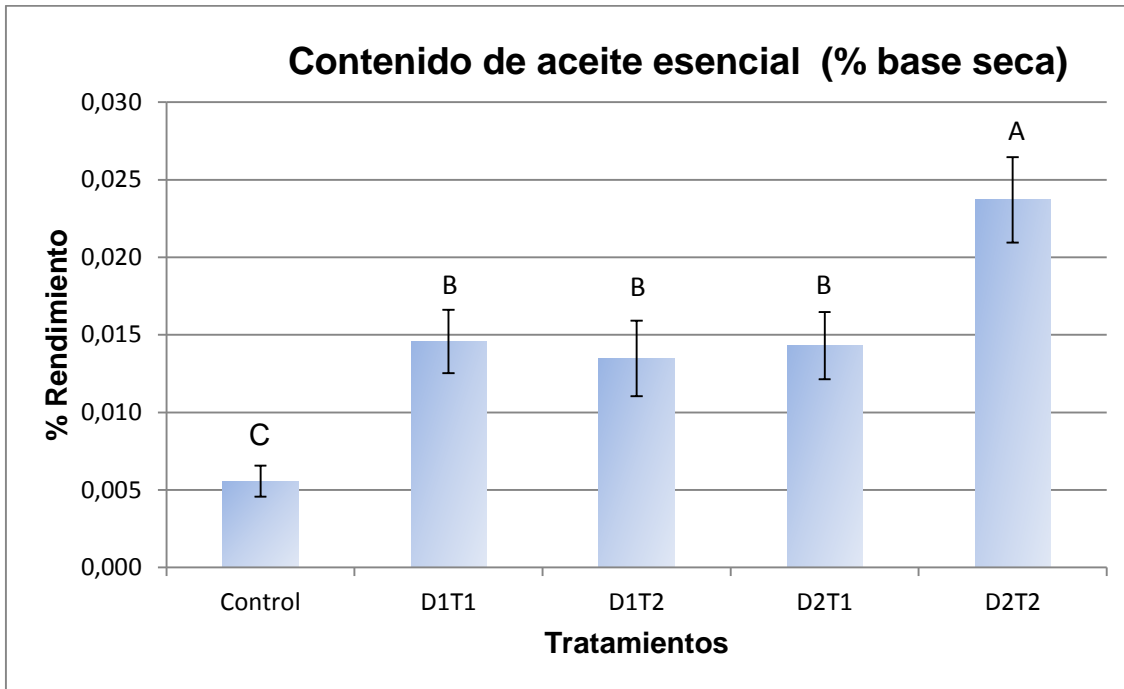


Figura 12. Contenido de aceite esencial (% base seca) para muestras de *Mentha spicata* L sometidas a radiación. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p > 0.5$)

La dosis 1 de radiación ($0,05 \text{ W} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^{-2}$) tuvo un efecto sobre la cantidad de aceite esencial de manera independiente al tiempo de adaptación, mientras que el efecto de la dosis 2 de radiación ($0,075 \text{ W} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^{-2}$) fue dependiente del tiempo, siendo mayor con el tiempo de adaptación de 48 horas. Estos resultados podrían indicar que la dosis 1 genera un efecto de “pulso” en la producción de aceite esencial mientras que la dosis 2 genera un efecto a mediano – largo plazo. Estos resultados también pueden indicar que la dosis de radiación 2 es la dosis adecuada para generar un cambio permanente o semipermanente en el metabolismo de la planta y en especial en la ruta de síntesis de fenilpropanoides, lo cual es un resultado que puede ser aplicado tanto como tratamiento poscosecha como en la etapa de crecimiento de la planta.

Los anteriores resultados han sido parcialmente contrastados con estudios anteriores presentes en la literatura. En el caso del porcentaje de aceite esencial, el estudio publicado por Karousou (Karousou, Grammatikopoulos et al., 1998), menciona el efecto positivo de la radiación UV-B en la producción de aceites esenciales y se le atribuye este aumento a la estimulación de la PAL en la ruta de síntesis de los fenilpropanoides (Barnes, Jordan et al., 1988).

Otros estudios llevados a cabo sobre esta especie estudian el efecto que tiene la radiación sobre los perfiles de composición de los aceites esenciales, por ejemplo, el estudio de Dolzhenko (Dolzhenko, Berteá, Occhipinti, Bossi, & Maffei, 2010), se enfoca en la relación entre el efecto de la radiación ultravioleta y los mecanismos de producción de terpenoides y flavonoides en *Mentha piperita*, demostrando un aumento en la concentración de flavonoides al someter a radiación el tejido vegetal, lo cual confirmaría que para plantas de esta especie el principal efecto generado por la radiación UV-B es sobre su metabolismo.

El estudio llevado a cabo por Maffei (Maffei, Canova, Berteá, & Scannerini, 1999) empleó radiación UV-A como elicitador en *Mentha piperita*, encontrando efecto en variables como área foliar, índice de área foliar, contenido de aceite esencial, contenido de mentofurano, mentol y de clorofilas, lo que demostraría que la radiación UV-A si genera un efecto fisiológico apreciable en las plantas de esta especie a diferencia de la UV-B que generaría un estímulo en la producción de metabolitos secundarios.

7.1.2 Contenido de fenoles y flavonoides

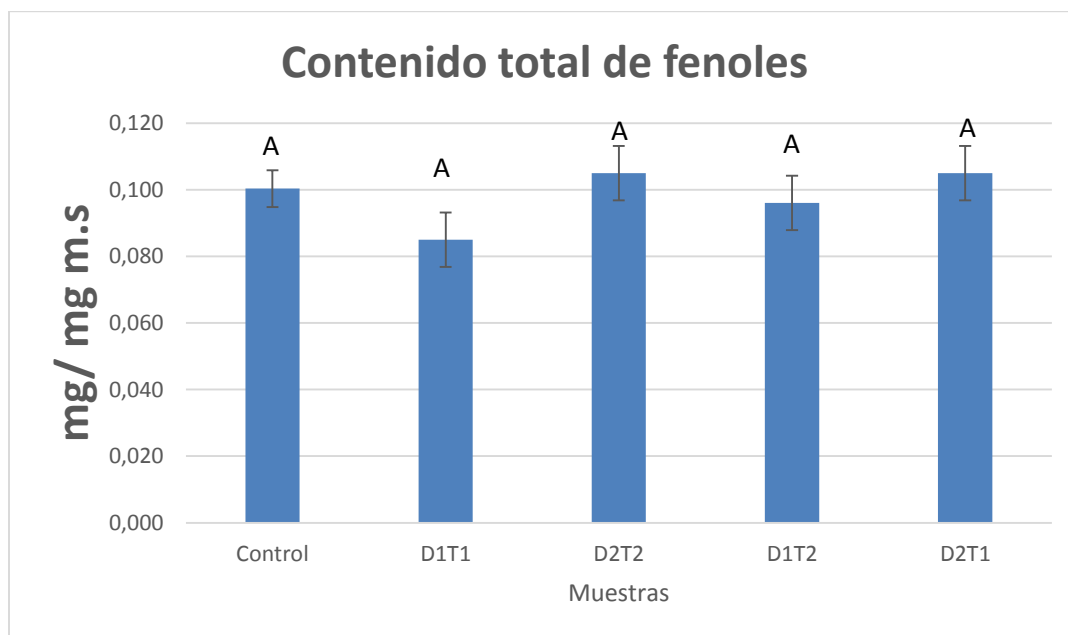


Figura 13. Contenido promedio total de fenoles para *Mentha spicata* L expresado en mg ácido gálico por mg de materia seca. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p > 0.05$).

El contenido total de fenoles y flavonoides medidos con las técnicas del ácido gálico y Folin- Ciocalteu no presentaron diferencias significativas generados por la aplicación de los tratamientos según mostró el análisis de varianza y la prueba de Tukey. El contenido de fenoles y flavonoides que se midieron en las muestras provenientes de las combinaciones de tratamientos (Figura 13 y 14) presentaron valores similares con respecto a la concentración encontrada en las muestras de control (0,100 mg/ mg materia seca para la concentración de fenoles y 0,046 mg/ mg materia seca para flavonoides).

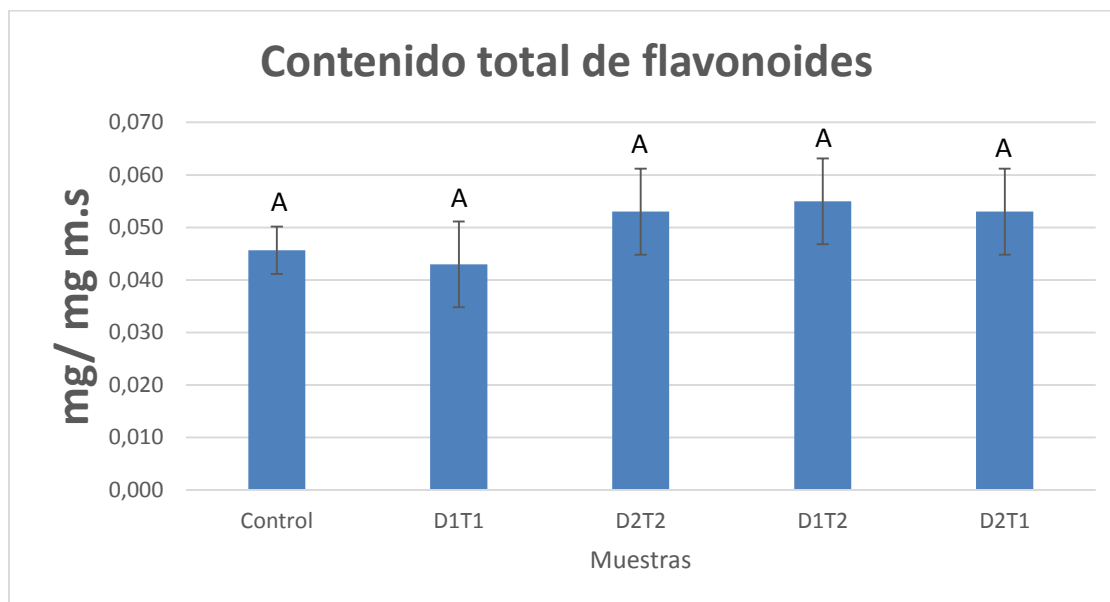


Figura 14. Contenido total promedio de flavonoides para *Mentha spicata* L expresado en mg de quercetina por mg de materia seca.

Estos resultados pueden sugerir que el efecto que se observó en el contenido de aceite esencial pueda deberse a la estimulación de producción de terpenos y terpenoides, los cuales son sintetizados en rutas sintéticas distintas como lo son la ruta del ácido mevalónico y la ruta MEP. En la literatura consultada no se han encontrado estudios en los cuales estudien el efecto de la aplicación de radiación UV-B en alguna de las enzimas implicadas en las anteriores rutas sintéticas. Inclusive algunos autores afirman que aún queda mucho por estudiar en las rutas sintéticas relacionadas con la síntesis de los principales componentes de los aceites esenciales (Rehman, Hanif, Mushtaq, & Al-Sadi, 2016)

Los anteriores resultados difieren de lo reportado por Maffei et al., 1999; quienes obtuvieron un aumento en la concentración de fenoles, sin embargo, en dicho estudio se

emplearon plantas en cultivo, las cuales se sometieron a radiación por un espacio de 1 hora diaria, mientras que en el presente estudio se emplearon plantas ya cosechadas. Se podría inferir que las plantas una vez cosechadas disminuyen su metabolismo y su respuesta al estrés no es tan activa como cuando están en cultivo, adicionalmente, el tejido no tiene el tiempo ni los nutrientes necesarios para generar compuestos en respuesta al elicitor. Es importante destacar que, pese a estas condiciones, la radiación no ocasionó un impacto negativo en las plantas. Esto concuerda con estudios realizados en el grupo de investigación previamente, con lo cual esto es una confirmación de dichos resultados. Por otra parte, es posible que las plantas del estudio de Maffei, al ser plantas de cultivo, también recibieron de manera natural radiación UV-A, la cual ha sido empleada en conjunto a radiación UV-B para estimular la producción de flavonoides como mecanismo de defensa para prevenir el posible impacto negativo sobre el ADN de las plantas (Luis, Pérez, & González, 2007).

7.1.3 Dienes Conjugados

Tras comprobarse la normalidad de los datos arrojados por la medición de dienos conjugados, se optó por el empleo del análisis de varianza para determinar la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos. Los valores obtenidos en el análisis de dienos conjugados a través de espectroscopia UV y sus varianzas son relacionados en la tabla 4 (Anexo) para los 15 días en los cuales se realizó el proceso de oxidación acelerada.

El análisis de varianza determinó que no existían diferencias significativas entre los antioxidantes empleados ($P > 0.05$), sin embargo, analizando el comportamiento de la concentración de dienos conjugados con respecto al tiempo, podemos observar que el aceite esencial proveniente del tratamiento D2T1 tuvo valores similares a los mostrados por los antioxidantes sintéticos empleados a modo de referencia (Figura 15).

Las demás muestras de aceite vegetal a las cuales se les adicionaron los aceites esenciales obtenidos a partir del material sometido a las combinaciones de radiación – tiempo de adaptación, mostraron comportamientos que muestran una mayor concentración de dienos conjugados con respecto al tiempo, y por lo tanto menor capacidad antioxidante, aunque el valor de dienos conjugados medidos en el control sin ningún tipo de antioxidantes siempre fue superior para todos los tratamientos, mostrando

que los demás tratamientos tienen capacidad antioxidante aunque esta sea menor a los antioxidantes comerciales empleados en el ensayo.

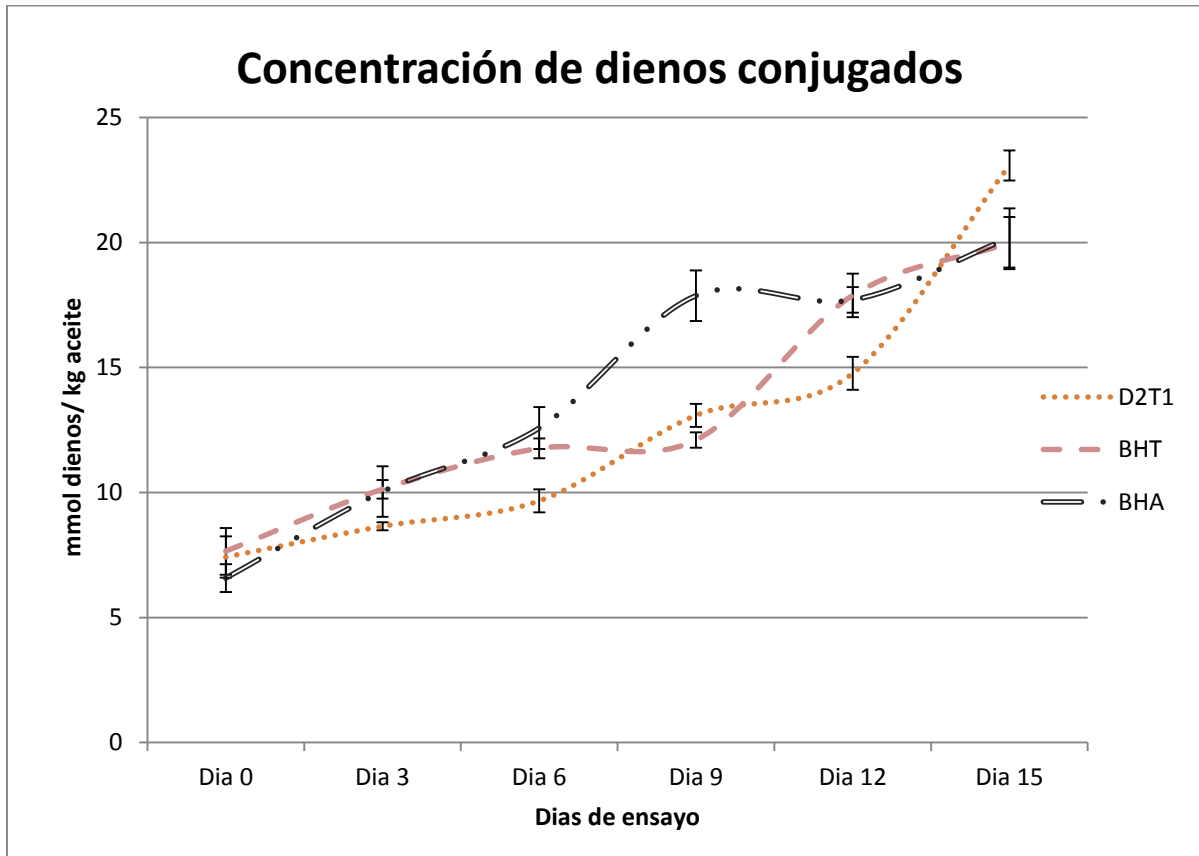


Figura 15. Concentración de dienos conjugados con respecto al tiempo para los aceites esenciales de *Mentha spicata* L

Con respecto al tratamiento D2T1, este en los primeros doce días de ensayo mantuvo valores de concentración de dienos conjugados ligeramente inferiores a los medidos en las muestras a las cuales se adicionaron BHT y BHA, y en la medición del último día de ensayo (día 15 de oxidación continua) (ver Figura 13), aumentó ligeramente su concentración. Esto demuestra que, si aplicamos aceite esencial de menta obtenido a partir de material sometido a radiación UV-B en una dosis de 0,075 W. h .m⁻² y sometido a un tiempo de adaptación de 1 hora en una concentración de 200 ppm a aceite vegetal apto para consumo humano, este aceite se conservara por un tiempo similar que si adicionamos BHA o BHT a 200 ppm, lo cual lo convierte en una alternativa para la conservación de aceites vegetales en condiciones de almacenamiento sin que se genere rechazo por parte del consumidor por ser un antioxidante de origen natural.

7.1.4 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Al aplicar la prueba de Shapiro Wilk, se determinó que los datos no presentaban un comportamiento normal, entonces se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para analizar la presencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos (Tabla 5 - Anexo).

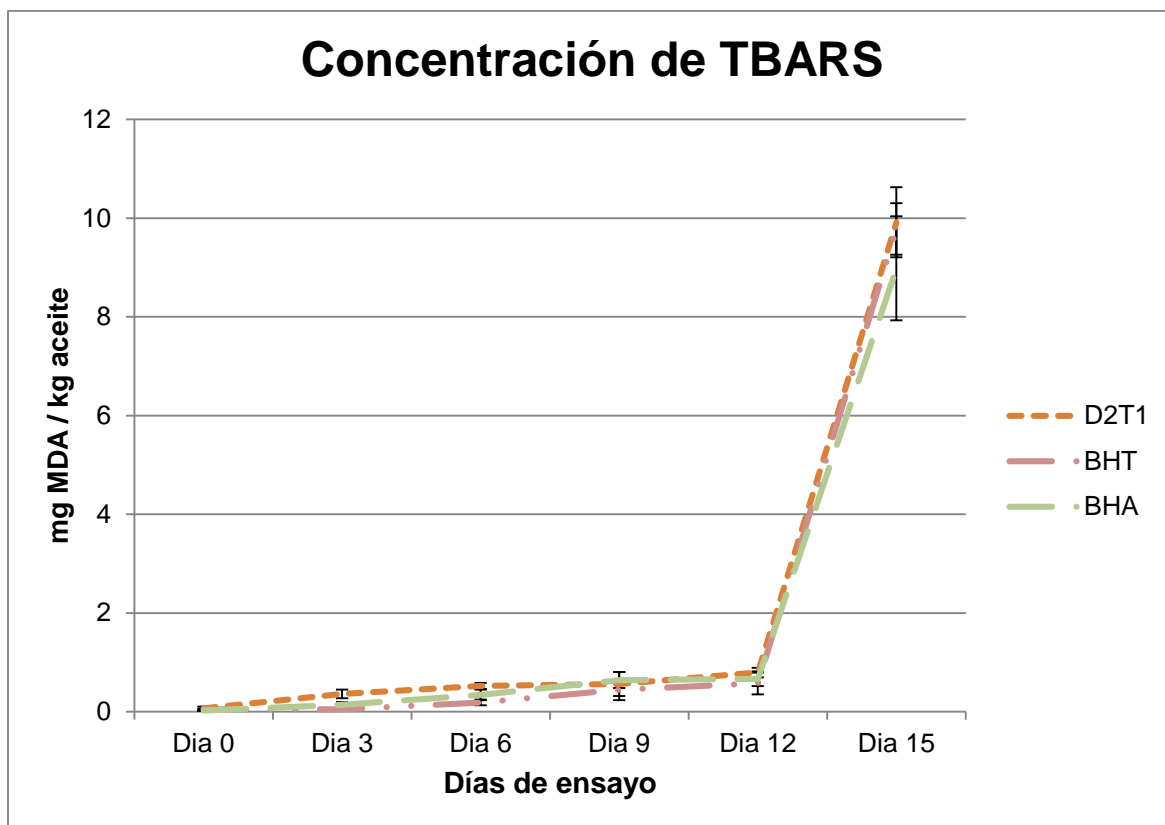


Figura 16. Concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) con respecto al tiempo para los aceites esenciales de *Mentha spicata* L

El estadístico P de la prueba de Kruskal Wallis tuvo un valor superior a 0.05, mostrando que no existía diferencias significativas entre los valores de TBARS obtenidos de cada una de las muestras con aceites esenciales, controles y antioxidantes sintéticos, este resultado fue confirmado cuando se aplicó el test de Tukey en búsqueda de diferencias entre los tratamientos, las cuales tampoco fueron significativas. Al igual que en el caso de dienos conjugados, solo la muestra de aceite a la que se agregó el aceite esencial obtenido del tratamiento D2T1 tuvo un comportamiento similar a los antioxidantes comerciales (Ver Figura 16). Si se observa la magnitud de la varianza de los valores para el día 15 de ensayo podemos inferir que los valores obtenidos son prácticamente iguales para el tratamiento como para los antioxidantes sintéticos.

El anterior resultado muestra nuevamente que el aceite esencial obtenido del material vegetal sometido a la dosis 2 de radiación y el tiempo de adaptación 1 al ser empleado como antioxidante en aceite vegetal comestible posee capacidad antioxidante similar a sustancias de origen sintético que actualmente se emplean como aditivos para la conservación de lípidos en almacenamiento.

Según los anteriores resultados, la aplicación de radiación UV-B en combinación a tiempos de adaptación de 24 y 48 horas, no generó un cambio evidente en la capacidad antioxidante de los aceites esenciales obtenidos a partir del material vegetal sometido a dichos tratamientos, esto, junto a los resultados obtenidos en la medición del contenido total de fenoles y flavonoides, muestran que la radiación no genera un estímulo que genere un aumento en la concentración de polifenoles o flavonoides, sin embargo, el aumento en el porcentaje de aceite esencial, podría indicar un efecto positivo sobre la producción de terpenos simples. Se esperaba que la radiación generase una estimulación de la producción de compuesto de tipo flavonoide al estimular enzimas como la PAL y la chalcona sintasa. Estos compuestos tienen una capacidad antioxidante ha sido ampliamente reportada, sin embargo, en las condiciones de ensayo, no se evidenció dicho efecto.

7.2 *Thymus vulgaris* L

7.2.1 Contenido de aceite esencial

La cantidad de aceite esencial obtenido a partir de las muestras de *Thymus vulgaris* irradiadas y sometidas a tiempos de adaptación no se vio afectada de manera significativa por los tratamientos previamente mencionados como se puede observar en la Figura 17. Los valores que se obtuvieron de rendimiento de aceite esencial son cercanos al reportado por las muestras control (Tabla 6 – Anexo).

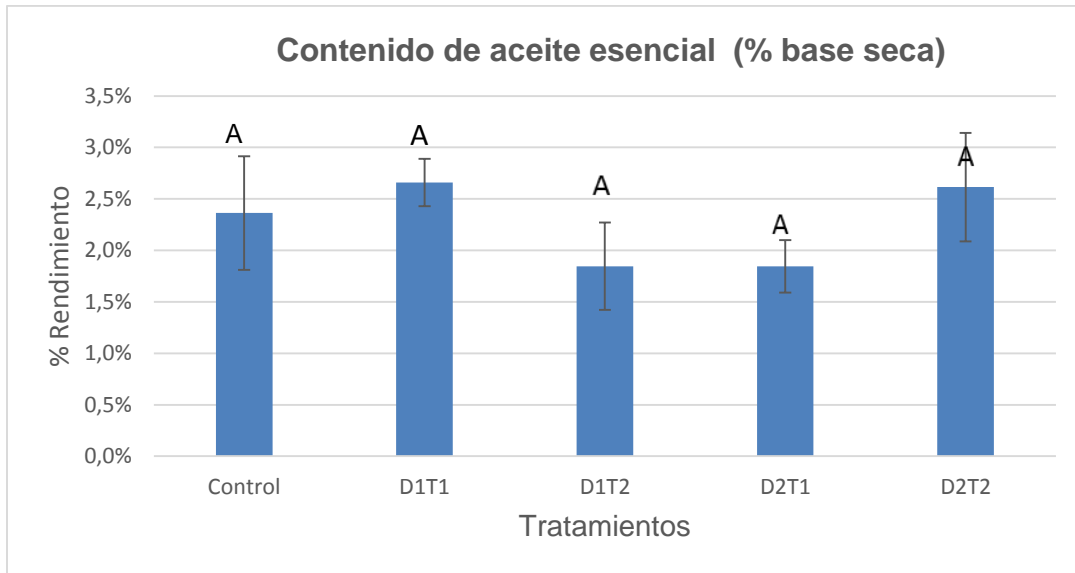


Figura 17. Contenido de aceite esencial (% base seca) para muestras de *Thymus vulgaris* L sometidas a radiación. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p > 0.5$)

7.2.2 Contenido de fenoles y flavonoides

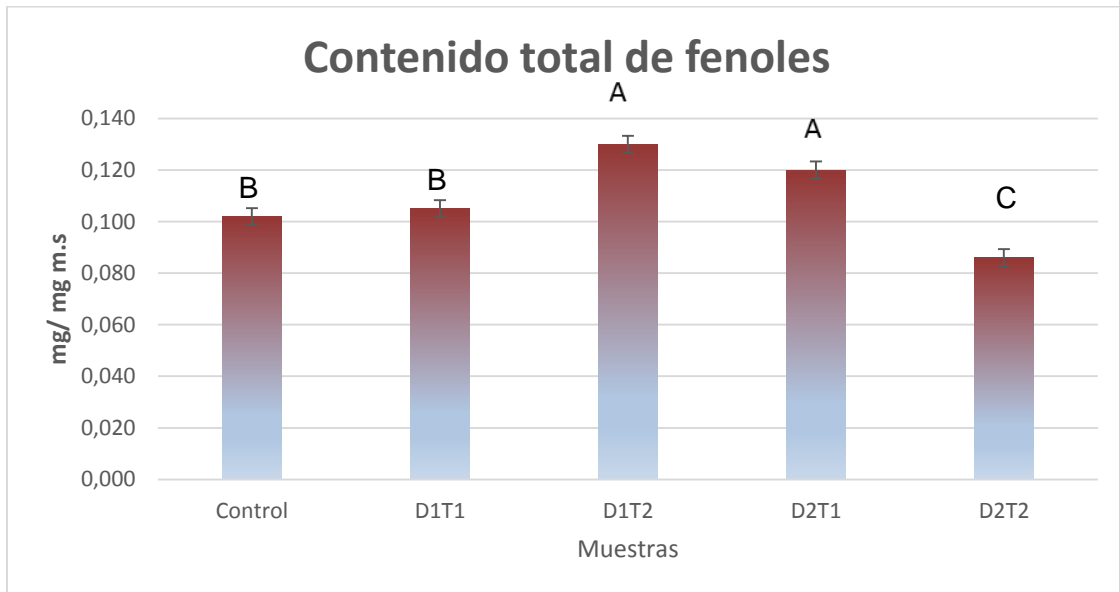


Figura 18. Contenido promedio total de fenoles para *Thymus vulgaris* expresado en mg ácido gálico por mg de materia seca. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p > 0.5$).

El contenido total de fenoles se vio fuertemente influenciado por los tratamientos aplicados, el análisis de varianza mostró la presencia de diferencias significativas entre los

tratamientos y el test de Tukey mostró que tanto la aplicación de radiación como el tiempo de adaptación tienen efecto en la cantidad de fenoles. El contenido total de fenoles se vio estimulado por los tratamientos combinados D1T2 y D2T1 con incrementos en la cantidad de fenoles de 21,54% y 15,00% respectivamente. Caso contrario se evidenció en la combinación de tratamientos D2T2, el cual evidenció un decrecimiento de -18,6% con respecto al control. La combinación de tratamientos D1T1 no presentó diferencia significativa con respecto al control frente a ambos factores (Figura 18).

La cantidad de flavonoides fue desestimulada por la aplicación de los tratamientos del estudio, las diferencias entre tratamientos se dividió en tres grupos como se puede observar en la Tabla 6 (Anexo), las combinaciones de tratamientos D1T1, D1T2 y D2T1 presentan diferencia significativa con respecto al control pero no entre sí, mientras que la combinación de tratamientos D2T2 tiene un valor mínimo de cantidad de flavonoides de 0,047 mg de quercetina por mg de masa seca, lo que representa una disminución del 20,57% con respecto al control (ver Figura 19).

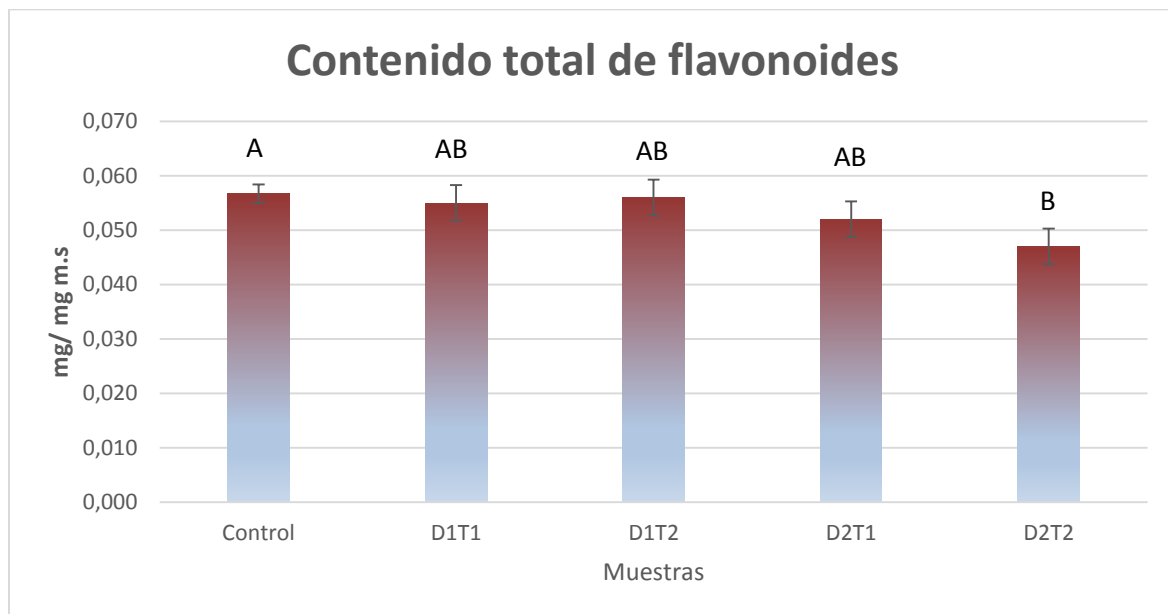


Figura 19. Contenido total promedio de flavonoides para *Thymus vulgaris* expresado en mg de quercetina por mg de materia seca.

Los resultados anteriores confirmarían la estimulación de la ruta metabólica de los fenilpropanoides, en especial de la enzima fenilalanina amonio liasa como ha sido reportado en otras especies por diversos autores (Zhang & Björn, 2009) al aumentar la cantidad de fenoles totales. La disminución en la cantidad de flavonoides que se midió

puede deberse a que los flavonoides presentes de antemano en el tejido vegetal actuaron como antioxidantes y se degradaron a compuestos no activos (Dall'Acqua, Miolo, Innocenti, & Caffieri, 2012) y que el metabolismo del tejido no se vio estimulado o no pudo activar los mecanismos de defensa para aumentar la concentración de compuestos de tipo flavonoide como respuesta ante el estímulo.

7.2.3 Dienes Conjugados

Los datos obtenidos para el parámetro de dienos conjugados en los 15 días de ensayo de oxidación acelerada en las muestras de aceite vegetal aditivadas con los aceites esenciales provenientes de las muestras sometidas a radiación – tiempos de adaptación se muestran en la Tabla 7 (Anexo) y en la Figura 20.

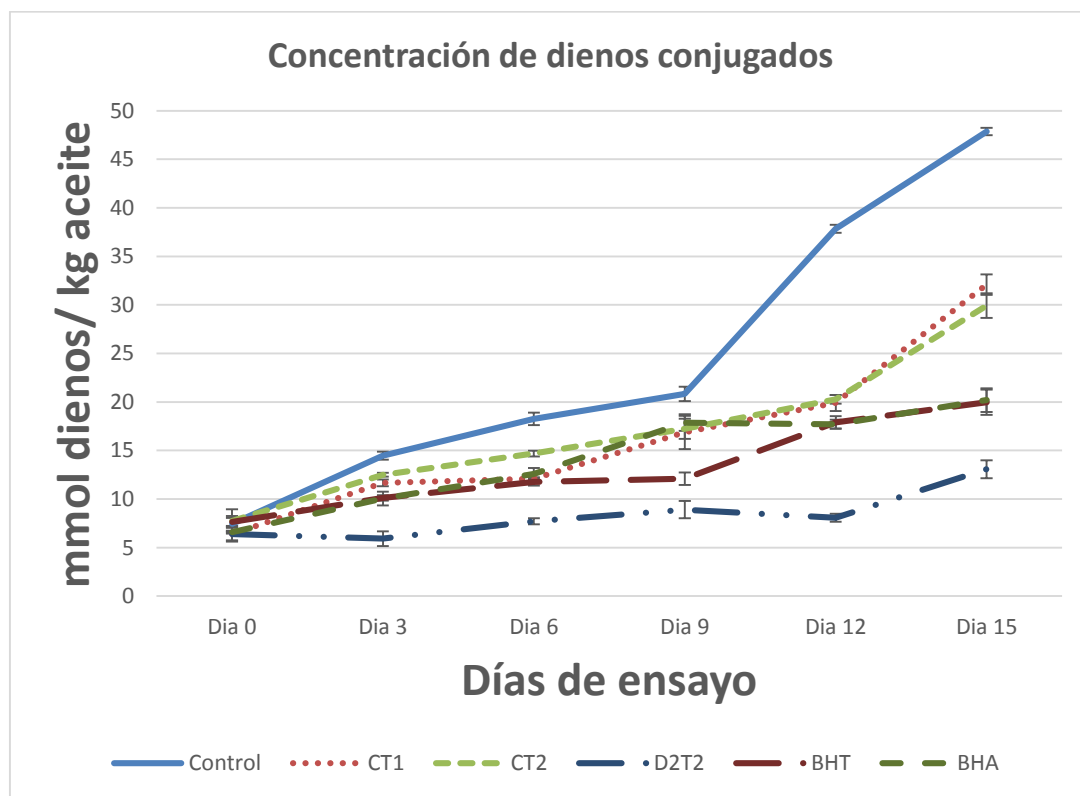


Figura 20. Concentración de dienos conjugados a través del tiempo para muestras de aceite aditivadas con aceite esencial proveniente de *Thymus vulgaris* sometido a radiación.

El análisis estadístico de los datos de concentración de dienos conjugados mostro un comportamiento normal corroborado por la prueba de Shapiro Wilk. Al realizar el análisis

de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey arrojó que existen diferencias significativas entre el control sin ningún aditivo antioxidante y las muestras de aceite mezcladas con aceite esencial proveniente de los controles con respecto al tiempo, BHA, BHT y las combinaciones de tratamientos D1T1, D1T2 y D2T1. También mostró que la combinación de tratamientos D2T2 posee diferencia significativa tanto con los demás aditivos, así como con el control sin ningún tipo de antioxidante. Al analizar los valores de concentración de dienos se observa que, aunque los demás aditivos poseen diferencia significativa, el aceite esencial proveniente de D2T2 reporta los menores valores de dienos conjugados (Figura 20), lo que equivale que tiene una mayor capacidad antioxidante entendida como la capacidad de disminuir la producción de esta clase de compuestos. Esta capacidad es inclusive mayor en comparación a los antioxidantes sintéticos que se emplearon a modo de referencia en el estudio.

En el día 15 de análisis, los valores reportados por la muestra a la cual se adicionó el aceite esencial proveniente de la combinación de tratamientos D2T2 es menor en 65,4% con respecto a los antioxidantes comerciales, esto significa que este aceite tendrá una vida útil superior en dicho porcentaje en comparación a un aceite al cual se le incorpore alguno de los dos antioxidantes sintéticos, otorgando más del doble de vida de anaquel a un aceite que emplee como antioxidante este aceite esencial según este parámetro.

7.2.4 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los datos obtenidos para la concentración de TBARS muestran un comportamiento no normal a nivel estadístico y por lo tanto se aplicó la prueba de Kruskal – Wallis que mostró la no existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo se puede observar que el comportamiento de la variable con respecto a los antioxidantes sintéticos empleados a modo de patrón es similar para los extractos obtenidos (Figura 21) y se observa que el tratamiento dosis 2 – tiempo de adaptación 2 posee un comportamiento mejor que el de sus similares.

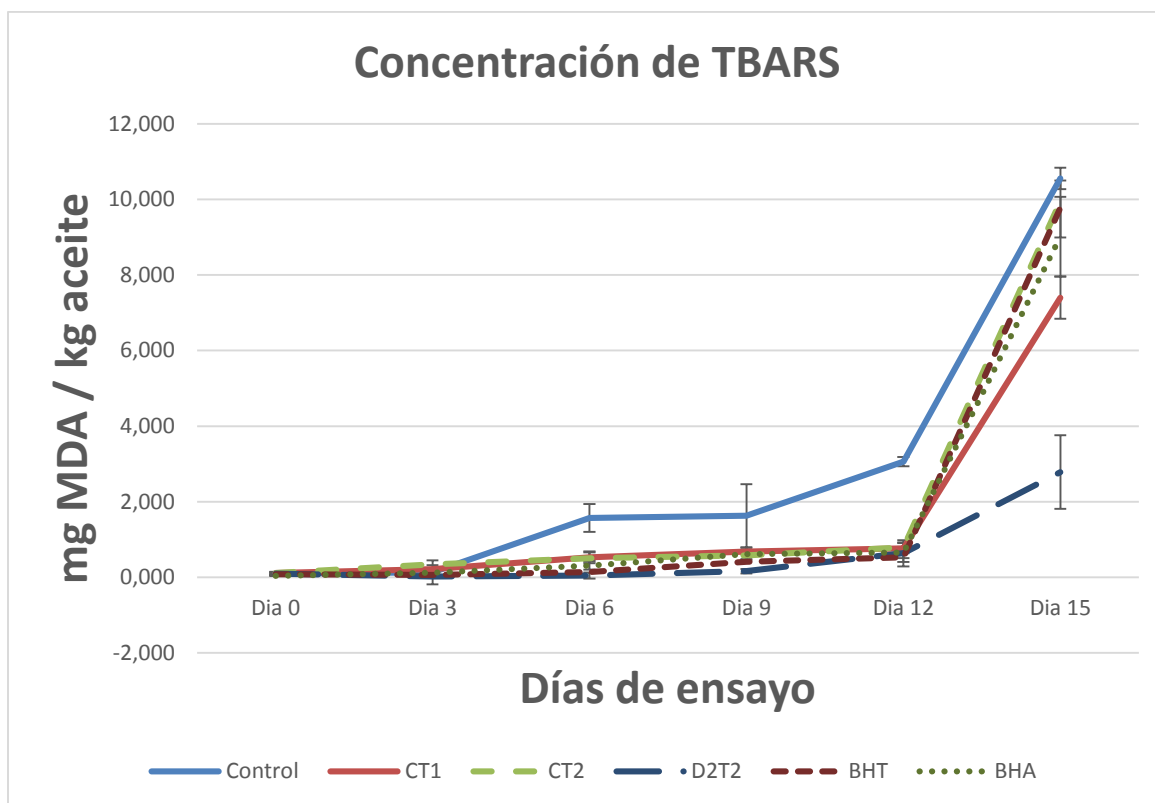


Figura 21. Concentración de TBARS (mg MDA/ kg aceite) a través del tiempo para muestras de aceite aditivadas con aceite esencial proveniente de *Thymus vulgaris* sometido a radiación.

La muestra con el aceite esencial proveniente del tratamiento D2T2 reportó los menores valores de TBARS en comparación a las demás muestras, siendo este valor menor en un 73,6 % con respecto al control sin ningún antioxidante, confirmando que dicho tratamiento posee capacidad antioxidante.

Si se comparan los valores del día 15 de estudio, el valor de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico para la muestra aditivada con el aceite esencial proveniente de la combinación de tratamientos dosis 2 – tiempo de adaptación 2 es 71,5% menor que el valor reportado por la muestra en la cual se empleó BHA como aditivo antioxidante (Tabla 8 – Anexo). Esto implica que, si se emplea el aceite esencial de tomillo sometido a estos tratamientos como aditivo antioxidante, se retrasara la formación de compuestos de tipo carbonilo en más del 70%, aumentando la vida útil del aceite en este mismo porcentaje.

La capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo ha sido ampliamente estudiada y se han identificado que compuestos como timol, carvacrol entre otros son los principales

responsables de dicha actividad. Los resultados obtenidos en la medición de la formación de dienos conjugados y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico indican que existe un aumento en la cantidad de estos compuestos debido a la aplicación de radiación UV-B o la formación de otros compuestos que tengan capacidad antioxidante.

Otros tratamientos ensayados en el estudio tuvieron comportamientos interesantes con respecto a los antioxidantes sintéticos, y podrían ser igualmente alternativas para su uso como aditivo en la industria de alimentos, sin embargo, el tratamiento D2T2, al tener un comportamiento tan marcado, generó especial interés. Una alternativa que no se exploró en el presente estudio es la combinación de aceites esenciales de diferentes tratamientos y su aplicación como aditivo, esto con el fin de identificar posibles efectos sinérgicos que puedan tener los compuestos presentes en los aceites esenciales y que pueden ser estimulados de manera diferencial por la aplicación de radiación UV-B como elicitor en poscosecha.

Al buscar estudios anteriores, solo se encontró el trabajo realizado por Dogu-Baykut y colaboradores en 2014 donde muestras de tomillo se sometieron a radiación UV-C en un reactor de lecho fluidizado con el fin de disminuir la carga microbiana presente en las muestras (Dogu-Baykut, Gunes, & Decker, 2014). En dicho estudio demostraron que la radiación UV-C tiene un alto potencial como agente bactericida al disminuir el recuento de CFU, y no afectó los parámetros de capacidad antioxidante medidos a través de la prueba DPPH. En este estudio también se estimó la capacidad antioxidante del extracto etanólico obtenido a partir del material vegetal irradiado al ser empleado como aditivo en una emulsión de aceite de maíz en agua a lo largo de 15 días de almacenamiento, los parámetros para medir el grado de oxidación fueron el índice de peróxidos y la formación de compuestos volátiles (hexanal) en el espacio de cabeza de las muestras. Al igual que los resultados obtenidos en la prueba de DPPH, la capacidad antioxidante fue similar entre el control sin radiación y los extractos de material irradiado.

En un estudio realizado con anterioridad dentro del grupo de investigación, se observó un efecto positivo y estadísticamente significativo en la cantidad de extracto que se obtiene de tomillo sometido a radiación UV-B (resultados sin publicar), estos resultados no entran en conflicto con los obtenidos en el presente estudio, pues el método de obtención del extracto fue diferente, extrayéndose de la matriz vegetal compuestos de mayor complejidad y de polaridad más alta.

Los resultados anteriores al ser analizados junto con los ensayos aquí reportados y las experiencias anteriores realizadas en el grupo de investigación en poscosecha del Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia, sugieren que los posibles efectos que pueda generar la radiación UV-B sobre *Thymus vulgaris* se verán con mayor claridad si se aplica la radiación en la etapa de cultivo y además se le suplementa con radiación UV-C como se ha realizado en estudios con plantas similares (Kumari, Agrawal, Singh, & Dubey, 2009; Luis, Pérez et al., 2007).

7.3 *Rosmarinus officinalis* L

7.3.1 Contenido de aceite esencial

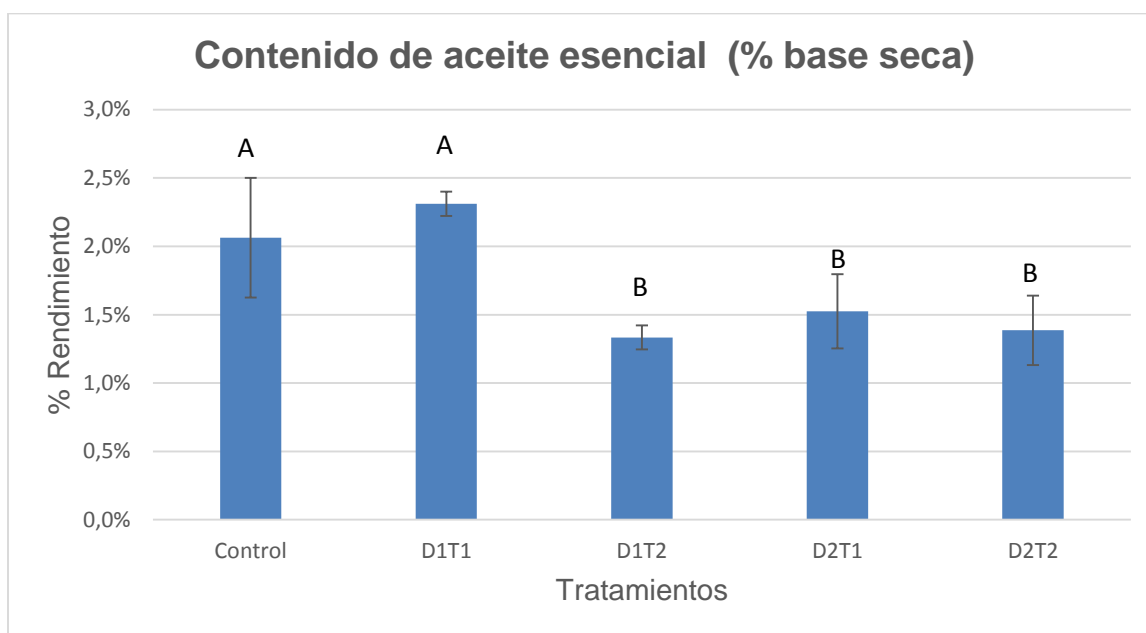


Figura 22. Contenido de aceite esencial (% base seca) para muestras de *Rosmarinus officinalis* L sometidas a radiación. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p > 0.5$)

El análisis de varianza realizado sobre los datos de rendimiento de aceite esencial arrojó que existe diferencia significativa entre los valores obtenidos, con un ligero aumento para la combinación de tratamientos dosis 1, tiempo de adaptación 1 en comparación a las demás combinaciones de tratamientos, los cuales influenciaron de manera negativa a dicha variable (Figura 22). El resultado estadístico nos indica que la radiación UV-B en las condiciones aplicadas en combinación a los tiempos de adaptación empleados, generan

efectos mayoritariamente negativos sobre la cantidad de aceite esencial que se puede obtener de muestras de *Rosmarinus officinalis* (Tabla.9- Anexo).

7.3.2 Contenido de fenoles y flavonoides

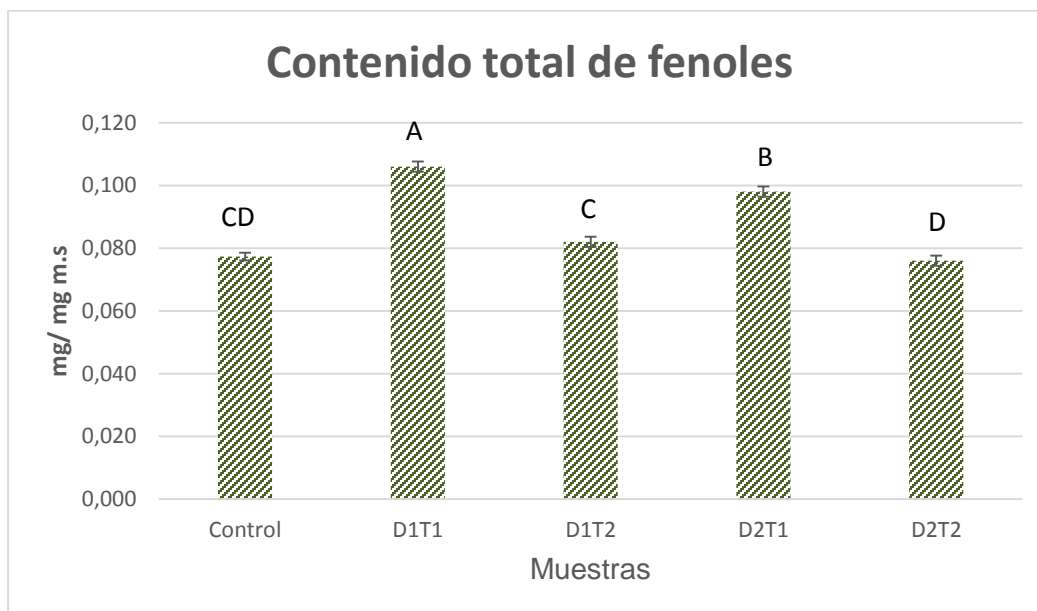


Figura 23. Contenido promedio total de fenoles en muestras de *Rosmarinus officinalis* sometidas a radiación UV-B expresado en mg ácido gálico por mg de materia seca. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p > 0.5$)

El contenido total de fenoles se vio fuertemente influenciado por la aplicación de los tratamientos como se puede observar la figura 21. Los máximos valores se obtuvieron para las combinaciones de tratamientos D1T1 y D2T1, los cuales fueron estadísticamente diferentes frente a las otras combinaciones de tratamientos. Este resultado sugiere que el tiempo de adaptación puede tener una influencia negativa en dicha variable ya que se observa que para las combinaciones de tratamientos en los cuales el tiempo de adaptación fue 48 horas (T2) reportan valores similares al obtenido en las muestras control (Figura 23). Según los anteriores resultados puede inferirse que la radiación, en especial en la dosis 1, genera un efecto positivo sobre la producción de fenoles, sin embargo, un tiempo de adaptación muy largo genera un decrecimiento en dicha concentración, posiblemente porque los fenoles se degradan al neutralizar especies reactivas de oxígeno, el cual sería el mecanismo plausible por el cual el tejido responde ante el estímulo.

El contenido total de flavonoides no se vio afectado de manera significativa a nivel estadístico por la aplicación de los tratamientos, aunque si se puede visualizar un efecto positivo general en la aplicación de los tratamientos (Figura 24). Estos resultados pueden deberse a la misma razón por la cual el contenido total de fenoles disminuya con respecto al tiempo de adaptación, y esto confirmaría que, aunque la aplicación de radiación UV-B si genera un efecto positivo sobre la producción de estas dos clases de metabolitos secundarios, la posible presencia de especies reactivas de oxígeno como el principal desencadenante de la respuesta del tejido, hace que el efecto sea bajo o nulo sobre la producción total de estos metabolitos.

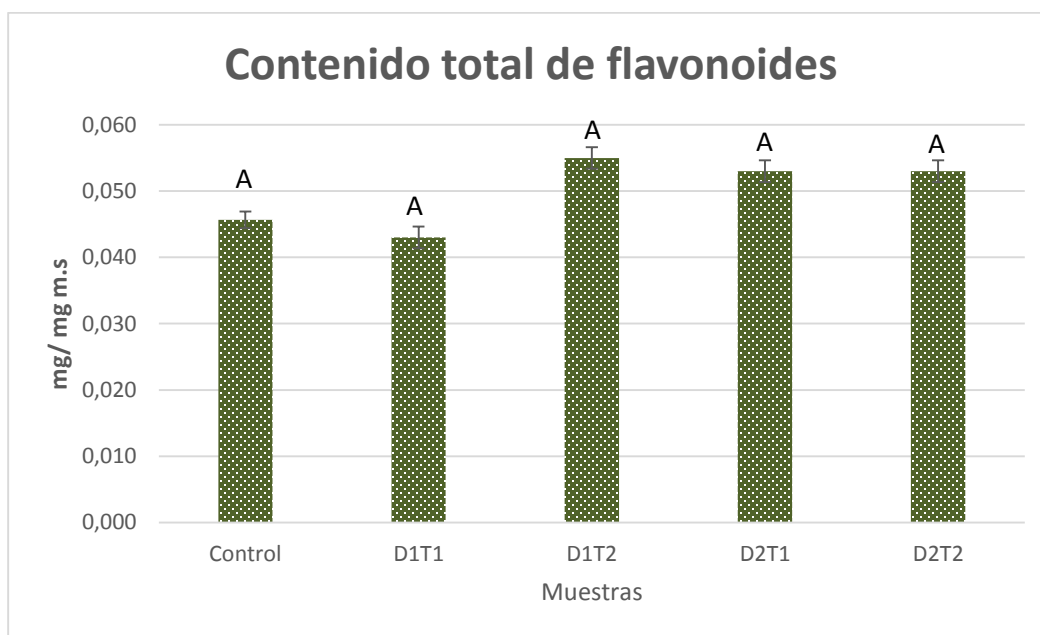


Figura 24. Contenido total promedio de flavonoides en muestras de *Rosmarinus officinalis* sometidas a radiación UV-B expresado en mg de quercetina por mg de materia seca. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p > 0.5$)

7.3.3 Dienes Conjugados

Los análisis estadísticos realizados sobre los valores obtenidos de la concentración de dienos conjugados en las pruebas de oxidación mostraron que dichos valores presentan diferencias estadísticamente significativas. Las combinaciones de tratamientos D2T1 y D2T2 fueron las que mostraron mayor capacidad antioxidante según este parámetro, obteniéndose valores del orden del 77,2 % y 74,9% menos que el control sin ningún tipo de antioxidante (Figura 25). Si se compara con las muestras a las cuales se les adicionó

antioxidantes sintéticos (BHA y BHT), la diferencia entre los valores alcanza el 54,4% y 60,0% respectivamente, lo que equivale a que el uso de estos aceites esenciales como antioxidantes en una concentración de 200 ppm mejora la vida de anaquel de un aceite vegetal comestible en más del doble que lo haría un antioxidante sintético (Tabla 10 – anexo).

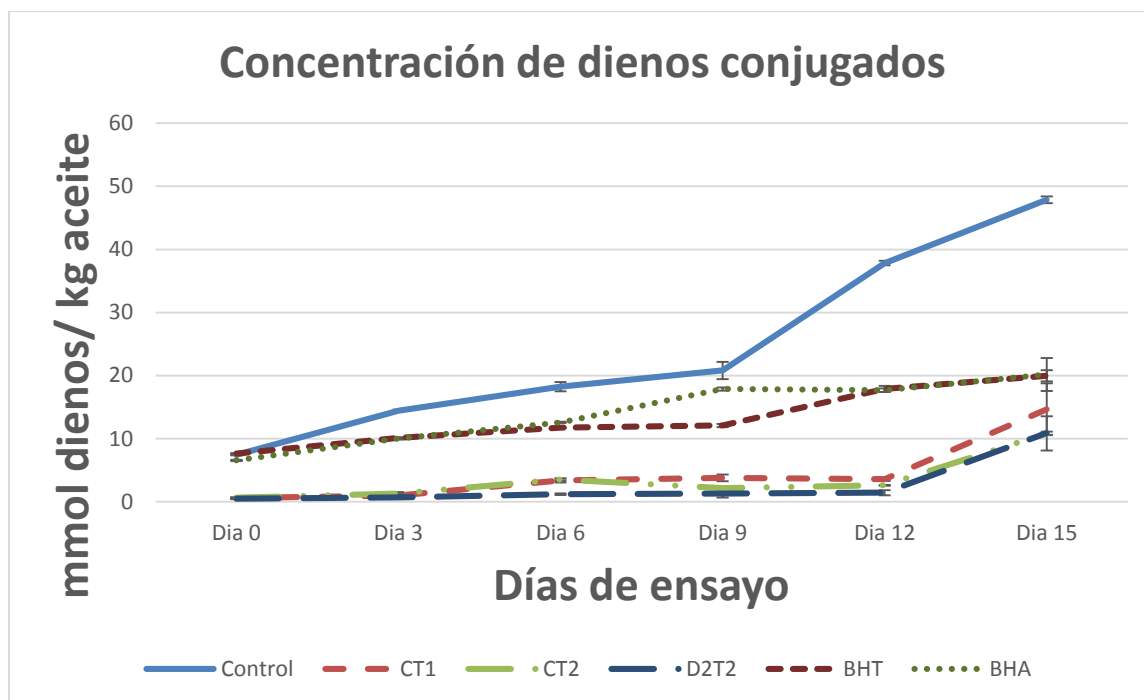


Figura 25. Concentración de dienos conjugados a través del tiempo para *Rosmarinus officinalis* expresados en mmol dienos/ kg de aceite.

7.3.4 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Al analizar los datos obtenidos al cuantificar las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, estos poseen un comportamiento no normal, por lo tanto, es necesario emplear una prueba de Kruskal Wallis para su análisis estadístico, en la tabla 11 (Anexo) se pueden ver los datos de TBARS para todas las muestras en los 15 días de ensayo de oxidación acelerada junto al resultado de test de Tukey y varianzas para cada valor. Esta prueba arrojó que no existen diferencias significativas entre los datos, sin embargo, se puede inferir a partir de la figura y los datos obtenidos que las mejores combinaciones de tratamientos fueron las combinaciones D1T2 y D2T2 (Figura 26).

Las combinaciones de tratamientos D1T2 y D2T2 mostraron valores menores en un 50% con respecto al control sin ningún tipo de antioxidante y de alrededor de 46% con respecto a los antioxidantes sintéticos empleados a modo de referencia, con lo cual, unido a los resultados obtenidos en la medición del parámetro de dienos conjugados, aumentaría la vida útil o de anaquel de un aceite vegetal en alrededor de un 50% más con respecto a un aceite aditivada con BHA o BHT (ver tabla 11 - Anexo).

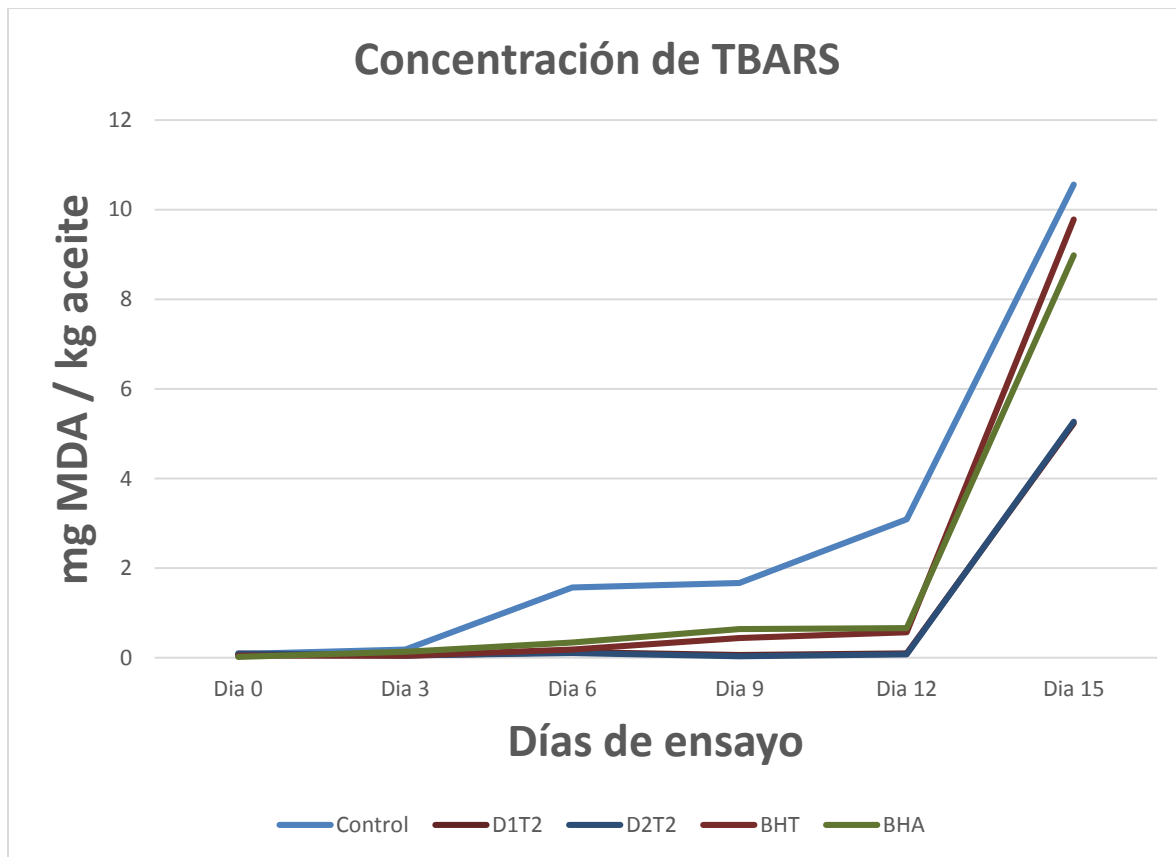


Figura 26 Concentración de TBARS (mg MDA/ kg aceite) a través del tiempo para muestras de aceite aditivadas con aceite esencial proveniente de *Rosmarinus officinalis* L sometido a radiación

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de oxidación confirman la naturaleza antioxidante que posee el aceite esencial de romero sobre aceites vegetales y lípidos. Este aceite esencial ya es aplicado como aditivo antioxidante en algunas aplicaciones en alimentos como por ejemplo en embutidos (Bomgardner, 2014). La capacidad antioxidante del aceite esencial de romero es atribuida generalmente a la presencia de ácido carnósico y ácido rosmarínico, los cuales son compuestos con alta capacidad antioxidante y se

emplean como aditivos tanto en la industria de alimentos como en otras industrias que requieran de compuestos con esta propiedad.

La revisión de literatura actual sobre la aplicación de radiación UV-B en *Rosmarinus officinalis* arrojó la no existencia de trabajos publicados sobre el mismo en la actualidad, por lo cual no fue posible realizar una comparación directa de los resultados aquí obtenidos con los obtenidos por otros investigadores, convirtiendo este estudio en pionero en el área de aplicación de radiación ultravioleta en esta especie. Se espera que este estudio sea el punto de partida para investigaciones que logren elucidar de una manera más específica el efecto de la aplicación de dicha radiación en *Rosmarinus officinalis*, así como su posible aplicación industrial y generación de valor agregado a este cultivo y sus derivados.

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

- La aplicación de radiación ultravioleta B tiene impacto positivo sobre la cantidad de aceite esencial que se puede obtener a partir de muestras de *Mentha spicata* L, lo que demuestra que la aplicación de radiación UV-B puede generar un valor agregado al cultivo de dicha especie.
- En el presente estudio no se evidenciaron diferencias significativas generadas por la aplicación de radiación UV-B sobre la concentración de fenoles y flavonoides en *Mentha spicata* L según las técnicas empleadas, sugiriendo que, si se desea estimular la producción de metabolitos de interés, es necesario aplicar la radiación UV-B en cosecha alternada con luz natural, como se realizó en un estudio previo consultado.
- Para evaluar de una manera más específica si se genera algún efecto sobre la producción de fenoles y flavonoides en *Mentha spicata*, es recomendable repetir el presente estudio y hacer un análisis de Cromatografía Líquida de alta Capacidad (HPLC) que no solo cuantificaría la cantidad de fenoles y flavonoides presentes en las muestras provenientes de los tratamientos sino también puede identificar que fenoles y flavonoides se producirían al aplicar los tratamientos.
- La aplicación de radiación UV-B tiene un efecto limitado sobre la capacidad antioxidante del aceite esencial extraído a partir *Mentha spicata* sometido a tratamiento, esto se evidencia en que la mayoría de tratamientos mostraron una capacidad limitada comparados con antioxidantes sintéticos, aunque, según los resultados obtenidos, al aplicar una dosis alta de radiación en conjunción a un tiempo de adaptación corto podría estimular dicha capacidad.

- El aceite esencial de *Mentha spicata* L obtenido a partir de muestras sometidas a los tratamientos empleados en este estudio mostraron una capacidad antioxidante similar a antioxidantes sintéticos de uso común como lo son el BHA y el BHT, por lo cual pueden ser empleados como sustitutos de estos últimos con la misma capacidad y tiempo de vida útil que ofreciese algunos de estos antioxidantes sintéticos.
- La aplicación de los tratamientos combinados dosis de radiación – tiempo de adaptación, no generó ningún tipo de efecto en la cantidad de aceite esencial que se extrajo de las muestras a través de arrastre con vapor, posiblemente porque para *Thymus vulgaris*, la aplicación de radiación UV-B en combinación a tiempos de adaptación no estimule la producción de terpenos.
- La cantidad de fenoles totales se vio fuertemente influenciada en *Thymus vulgaris* por la aplicación de los tratamientos, teniéndose un máximo en la combinación de tratamientos D1T2, mientras que en la combinación de tratamientos D2T2 se presentó una disminución en la cantidad de fenoles totales en comparación al control.
- La cantidad de flavonoides medida en muestras secas de *Thymus vulgaris* mostró un comportamiento negativo con respecto a la aplicación de radiación, lo cual puede deberse a la degradación de flavonoides por efecto de la radiación ultravioleta y a una nula o baja respuesta por parte del metabolismo.
- Las pruebas de capacidad antioxidante mostraron que los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* obtenidos tienen una capacidad antioxidante mayor a los antioxidantes sintéticos que se emplearon como patrones y el extracto proveniente del tratamiento D2T2 mostro el mejor comportamiento entre los aceites esenciales ensayados.
- Los resultados indican que la aplicación de radiación en combinación con tiempos de adaptación genera un estímulo en la producción de fenoles totales y en la capacidad antioxidante del aceite esencial que se obtiene a partir de la materia seca, indicando que dichos tratamientos mejoran las cualidades de *Thymus vulgaris* como posible fuente de aditivos antioxidantes de uso en la industria de alimentos y como alternativa frente al empleo de antioxidantes de origen sintético.

- La cantidad de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* que se obtiene de muestras sometidas a radiación UV-B y tiempos de adaptación entre 24 y 48 horas no se ve afectada de manera significativa por dichos tratamientos en las condiciones de estudio.
- La aplicación de radiación UV-B en combinación a tiempos de adaptación genero cambios en las concentraciones de fenoles presentes en la materia seca de las muestras de *Rosmarinus officinalis* que fueron cuantificados por las técnicas empleadas en el presente estudio y muestran que la radiación generó un efecto positivo sobre la concentración de fenoles totales, mientras que el tiempo de adaptación tuvo un efecto negativo sobre dicha variable.
- La cantidad total de flavonoides no se vio afectada significativamente por los tratamientos aplicados en el estudio, lo cual, unido a los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles, sugiere que el mecanismo de acción de la radiación UV-B en *Rosmarinus officinalis* es a través de la generación de especies reactivas de oxígeno que a medida que transcurre el tiempo a partir de la aplicación del estímulo reaccionan con los fenoles y flavonoides transformándolos en especies no activas, así disminuyendo su concentración final.
- Los aceites esenciales provenientes de *Rosmarinus officinalis* L poseen una fuerte actividad antioxidante y según los datos de concentración de dienos conjugados, actúa principalmente sobre los productos primarios de oxidación, confirmando la naturaleza de antioxidante primario que generalmente se les atribuye a los aceites esenciales.
- Al analizar el comportamiento de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico se confirma la capacidad antioxidante de los aceites esenciales de romero, en ambos casos el tratamiento con mayor capacidad antioxidante es la combinación de dosis 2 (0,075 W. h .m-2) y 48 horas de tiempo de adaptación, lo cual confirma que la aplicación de los tratamientos si tiene un efecto positivo sobre la capacidad antioxidante del aceite esencial que se obtenga a partir de material vegetal irradiado.

- La capacidad antioxidante exhibida por los aceites esenciales sugiere que la radiación UV-B estimula la producción de compuestos de tipo terpenoide con capacidad antioxidante en *Rosmarinus officinalis*. Un estudio cromatográfico de dichos aceites podría confirmar dichos resultados.
- A pesar de los resultados positivos obtenidos, no se obtuvieron valores óptimos de radiación y de tiempo de adaptación que maximice la capacidad antioxidante del aceite esencial, lo cual genera un nuevo campo de investigación sobre el tema y sobre esta especie en particular.
- La ausencia de reportes previos sobre radiación UV-B en esta especie de planta aromática (*Rosmarinus officinalis*) convierte este trabajo en pionero y en punto de partida a posibles estudios sobre la misma.

8.2 Recomendaciones

Las especies de plantas aromáticas estudiadas en la presente tesis mostraron diversos comportamientos frente a la aplicación de radiación UV-B, sin embargo, esto no significa que, por ejemplo, en el caso de la especie *Mentha spicata* L, esta muestre un efecto bajo a la radiación UV-B, sino que en las condiciones que se emplearon en el estudio, su respuesta metabólica fue baja en comparación a las mostradas por las otras dos especies. Por este motivo el presente trabajo crea un punto de partida para la investigación de la aplicación de radiación UV-B tanto como tratamiento poscosecha (que se investigó de manera parcial en este trabajo) como a modo de elicitor en la etapa de crecimiento de la planta.

Para las tres especies aún se puede investigar sobre los valores óptimos de dosis de radiación y de tiempo de adaptación que generen un cambio deseado en el tejido vegetal, que puede ser rendimiento de obtención de aceite esencial, cantidad de fenoles y flavonoides totales hasta capacidad antioxidante. También un campo de investigación de interés es la diferenciación de los fenoles y flavonoides que la aplicación de los tratamientos de radiación UV-B y tiempo de adaptación pueden estimular, pues el presente trabajo cuantificó la cantidad total de cada una de estas familias de compuestos, sin llegar a identificar el cambio o la presencia de compuestos específicos.

También es factible estudiar otros parámetros que no se tuvieron en cuenta en el presente trabajo debido al enfoque que se le dio desde su planteamiento. Algunos de esos parámetros pueden ser color de las hojas, peso fresco después de radiación, generación de volátiles, recuento de CFU entre otros.

Con respecto a la medición de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales obtenidos a partir del material vegetal irradiado, se obtuvieron resultados que son de especial interés para la industria de grasas y aceites y que pueden ser estudiados y extrapolados a otras matrices alimenticias donde la oxidación lipídica es un problema a tener en cuenta. Las concentraciones a las cuales se adicionaron los aceites esenciales siguieron las recomendaciones consignadas en el Codex Alimentarius, sin embargo, para el caso de la especie *Rosmarinus officinalis* L, puede ser interesante disminuir la concentración a la cual se aplican los aceites esenciales con el fin de determinar el efecto que puede tener cambiar dicho valor con respecto a su capacidad antioxidante.

Otro aspecto que quedó por fuera de la investigación tanto por tiempo como por disponibilidad de recursos fue la posibilidad de mezclar aceites esenciales provenientes tanto de la misma especie como de especies distintas en búsqueda de efectos sinérgicos o antagonistas que generen protección frente a los procesos naturales de oxidación. Siguiendo esta misma línea puede pensarse en el uso concomitante de antioxidantes sintéticos junto a aceites esenciales con el fin de poder disminuir la concentración necesaria de antioxidante sintético y brindar la máxima capacidad antioxidante posible.

Un aspecto que no se tuvo en cuenta en la realización de la tesis fue la posible alteración del *flavour* del aceite vegetal debido a la aplicación de aceites esenciales, de manera informal se realizaron algunas pruebas sensoriales que mostraron que los aceites esenciales empleados no generaron ningún tipo de efecto es este aspecto, sin embargo, dichos resultados no pueden ser tomados como concluyentes pues para determinar de manera eficaz si se genera algún efecto o no es necesario aplicar alguna de las técnicas del análisis sensorial junto con el entrenamiento de un panel de catación en degustación de aceites vegetales o el uso de equipos para evaluar la aceptabilidad de los aceites vegetales aditivados con aceites esenciales de las especies de plantas aromáticas trabajadas en el estudio.

Un campo de investigación adicional que puede ser de interés para la industria de alimentos es el estudio sobre el efecto que pueda tener estos aceites esenciales sobre la estabilidad térmica de aceites vegetales que se empleen en procesos de fritura, ya que estos procesos son muy rigurosos y generan un alto grado de estrés oxidativo en los lípidos, dando origen a un nuevo tema de investigación para una tesis posterior.

Como se puede leer en las anteriores conclusiones, este trabajo, al aunar dos líneas de investigación como lo son la aplicación de elicitores sobre tejidos vegetales y la investigación sobre antioxidantes de origen natural aplicados a aceites vegetales y en general a alimentos, genero una serie de inquietudes y posibilidades de investigación amplias y puede ser el punto de partida para la generación de nuevo conocimientos en ambos campos y es innovador al emplear especies aromáticas en las cuales no se han reportado estudios previos con esta clase de radiación y el posible empleo de sus aceites esenciales y extractos en diversas aplicaciones en el campo de los alimentos.

A. Anexo: Tablas de datos de resultados.

Tabla 2. Porcentajes de contenido de aceite esencial para *Mentha spicata* L. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p>0.5$)

Contenido de aceite esencial (% base seca)				
Control	0,006	±	0,001	C
D1T1	0,015	±	0,002	B
D1T2	0,013	±	0,002	B
D2T1	0,014	±	0,002	B
D2T2	0,024	±	0,003	A

Tabla 3. Promedio de contenido de polifenoles (mg ácido gálico/ mg materia seca) y flavonoides (mg quercetina/ mg materia seca) Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p>0.5$).

	Contenido de fenoles totales				Contenido de flavonoides totales			
Control	0,100	±	0,006	A	0,046	±	0,004	A
D1T1	0,085	±	0,008	A	0,043	±	0,008	A
D2T2	0,105	±	0,008	A	0,053	±	0,008	A
D1T2	0,096	±	0,008	A	0,055	±	0,008	A
D2T1	0,105	±	0,008	A	0,053	±	0,008	A

Tabla 4. Valores de dienos conjugados de aceite vegetal sometido a oxidación y aditivado con aceite esencial de *Mentha spicata* (mmol Hidroperóxidos/ kg aceite). Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p>0.5$).

	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15
Control	6,312 ± 1,345 a	11,863 ± 0,211 a	15,276 ± 0,391 a	17,801 ± 0,400 a	31,955 ± 0,402 a	39,832 ± 0,095 a
CT1	7,291 ± 0,722 a	11,514 ± 0,412 a	12,308 ± 0,232 a	17,192 ± 1,005 a	21,249 ± 1,321 a	32,235 ± 0,913 a
CT2	7,760 ± 0,788 a	13,045 ± 0,182 a	15,591 ± 0,531 a	17,618 ± 0,738 a	20,761 ± 0,070 a	30,872 ± 0,546 a
D1T1	6,743 ± 0,495 a	11,231 ± 0,270 a	12,176 ± 0,278 a	16,559 ± 0,299 a	22,358 ± 0,752 a	30,655 ± 0,730 a
D1T2	7,066 ± 1,071 a	10,908 ± 0,089 a	12,933 ± 0,308 a	18,843 ± 0,606 a	21,198 ± 0,260 a	29,023 ± 0,841 a
D2T1	7,421 ± 0,821 a	8,648 ± 0,158 a	9,666 ± 0,456 a	13,084 ± 0,461 a	14,762 ± 0,660 a	23,083 ± 0,600 a
D2T2	6,995 ± 0,491 a	11,120 ± 0,223 a	11,972 ± 0,203 a	18,108 ± 1,399 a	20,821 ± 1,237 a	26,602 ± 0,344 a
BHT	7,644 ± 0,939 a	10,127 ± 0,371 a	11,763 ± 0,397 a	12,097 ± 0,308 a	17,884 ± 0,870 a	19,979 ± 1,043 a
BHA	6,571 ± 0,556 a	10,036 ± 1,015 a	12,578 ± 0,838 a	17,873 ± 1,009 a	17,704 ± 0,509 a	20,184 ± 1,180 a

Tabla 5. Datos de TBARS para aceite vegetal aditivado con aceite esencial de *Mentha spicata* (mg MDA / kg aceite). Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p>0.5$).

	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15
Control	0,086 ± 0,026 a	0,182 ± 0,094 a	1,572 ± 0,367 a	1,672 ± 0,834 a	3,093 ± 0,125 a	10,561 ± 0,283 a
CT1	0,056 ± 0,030 a	0,616 ± 0,107 a	2,098 ± 0,157 a	2,461 ± 0,026 a	2,937 ± 0,138 a	10,250 ± 0,557 a
CT2	0,055 ± 0,046 a	0,659 ± 0,227 a	1,315 ± 0,062 a	1,645 ± 0,097 a	3,422 ± 0,383 a	10,438 ± 0,954 a
D1T1	0,071 ± 0,043 a	0,335 ± 0,142 a	0,504 ± 0,044 a	0,588 ± 0,360 a	0,846 ± 0,245 a	8,338 ± 0,394 a
D1T2	0,070 ± 0,036 a	0,359 ± 0,086 a	0,522 ± 0,064 a	0,563 ± 0,242 a	0,791 ± 0,095 a	9,918 ± 0,713 a
D2T1	0,070 ± 0,036 a	0,359 ± 0,086 a	0,522 ± 0,064 a	0,563 ± 0,242 a	0,791 ± 0,095 a	9,918 ± 0,713 a
D2T2	0,049 ± 0,026 a	0,642 ± 0,207 a	1,326 ± 0,079 a	1,644 ± 0,058 a	3,432 ± 0,348 a	10,392 ± 0,973 a
BHT	0,046 ± 0,020 a	0,046 ± 0,020 a	0,187 ± 0,060 a	0,444 ± 0,208 a	0,571 ± 0,221 a	9,783 ± 0,521 a
BHA	0,019 ± 0,008 a	0,136 ± 0,058 a	0,340 ± 0,107 a	0,641 ± 0,161 a	0,666 ± 0,149 a	8,982 ± 1,052 a

Tabla 6. Datos de Contenido de aceite esencial, cantidad de fenoles y flavonoides para muestras de *Thymus vulgaris* sometidas a radiación UV-B y dos tiempos de adaptación. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p>0.5$).

Tratamiento	Rendimiento	Fenoles	Flavonoides
Control	2,4% ± 0,6% A	0,102 ± 0,003 B	0,057 ± 0,002 A
D1T1	2,7% ± 0,2% A	0,105 ± 0,003 B	0,055 ± 0,003 AB
D1T2	1,8% ± 0,4% A	0,130 ± 0,003 A	0,056 ± 0,003 AB
D2T1	1,8% ± 0,3% A	0,120 ± 0,003 A	0,052 ± 0,003 AB
D2T2	2,6% ± 0,5% A	0,086 ± 0,003 C	0,047 ± 0,003 B

Tabla 7. Concentración de dienos conjugados a través del tiempo medidos en aceite vegetal comestible aditivado con aceite esencial de *Thymus vulgaris* sometido previamente a radiación, BHA, BHT y controles (mmol dienos/ kg aceite). Letras distintas muestran diferencia significativa entre los valores según el test de Tukey ($p>0,5$).

		Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15
Control	A	7,449 ± 0,786	14,471 ± 0,418	18,265 ± 0,637	20,833 ± 0,746	37,835 ± 0,415	47,871 ± 0,380
CT1	AB	6,386 ± 0,635	11,667 ± 0,346	12,092 ± 0,146	16,856 ± 1,728	19,892 ± 0,827	32,086 ± 1,046
CT2	AB	7,744 ± 1,190	12,499 ± 0,205	14,682 ± 0,307	17,224 ± 1,032	20,262 ± 0,442	29,936 ± 1,271
D1T1	AB	6,596 ± 0,769	11,540 ± 0,388	14,462 ± 0,860	18,885 ± 0,450	26,696 ± 1,454	24,460 ± 1,321
D1T2	AB	6,769 ± 0,977	10,163 ± 0,162	13,664 ± 0,248	12,341 ± 0,447	17,898 ± 0,415	18,532 ± 0,766
D2T1	AB	6,228 ± 0,314	11,760 ± 1,057	14,767 ± 0,812	16,995 ± 0,792	17,256 ± 0,340	23,612 ± 0,209
D2T2	B	6,389 ± 0,780	5,910 ± 0,767	7,714 ± 0,306	8,907 ± 0,877	8,079 ± 0,415	13,068 ± 0,922
BHT	AB	7,644 ± 0,407	10,127 ± 0,280	11,763 ± 0,372	12,097 ± 0,634	17,884 ± 0,644	19,979 ± 1,299
BHA	AB	6,571 ± 0,147	10,036 ± 0,711	12,578 ± 0,617	17,873 ± 0,866	17,704 ± 0,458	20,184 ± 1,209

Tabla 8. Concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico a través del tiempo medidos en aceite vegetal comestible aditivado con aceite esencial de *Thymus vulgaris* sometido previamente a radiación, BHA, BHT y controles (mmol MDA/ kg aceite). Letras distintas muestran diferencia significativa entre los valores según el test de Tukey ($p>0,5$).

		Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15
Control	A	0,101 ± 0,026	0,135 ± 0,094	1,570 ± 0,367	1,632 ± 0,834	3,063 ± 0,125	10,553 ± 0,283
CT1	A	0,116 ± 0,030	0,212 ± 0,107	0,527 ± 0,157	0,680 ± 0,026	0,771 ± 0,138	7,398 ± 0,557
CT2	A	0,116 ± 0,046	0,346 ± 0,227	0,507 ± 0,062	0,583 ± 0,097	0,788 ± 0,383	9,942 ± 0,954
D1T1	A	0,034 ± 0,043	0,130 ± 0,142	0,624 ± 0,044	0,708 ± 0,360	0,862 ± 0,245	5,169 ± 0,394
D1T2	A	0,087 ± 0,036	0,007 ± 0,086	0,120 ± 0,064	0,227 ± 0,242	0,245 ± 0,095	4,617 ± 0,713
D2T1	A	0,071 ± 0,036	0,025 ± 0,086	0,164 ± 0,064	0,170 ± 0,242	0,203 ± 0,095	4,005 ± 0,713
D2T2	A	0,101 ± 0,026	0,018 ± 0,207	0,047 ± 0,079	0,163 ± 0,058	0,636 ± 0,348	2,785 ± 0,973
BHT	A	0,077 ± 0,020	0,061 ± 0,020	0,144 ± 0,060	0,413 ± 0,208	0,529 ± 0,221	9,777 ± 0,521
BHA	A	0,040 ± 0,008	0,121 ± 0,058	0,312 ± 0,107	0,615 ± 0,161	0,656 ± 0,149	9,014 ± 1,052

Tabla 9. Datos de Rendimiento de extracción de aceite esencial, cantidad de fenoles y flavonoides para muestras de *Rosmarinus officinalis* L sometidas a radiación UV-B y dos tiempos de adaptación. Letras distintas denotan diferencia significativa según el test de Tukey ($p>0.5$).

Tratamiento	Rendimiento	Fenoles	Flavonoides
Control	2,1% ± 0,4% A	0,077 ± 0,001 CD	0,046 ± 0,004 A
D1T1	2,3% ± 0,1% A	0,106 ± 0,002 A	0,043 ± 0,008 A
D1T2	1,3% ± 0,1% B	0,082 ± 0,002 C	0,055 ± 0,008 A
D2T1	1,5% ± 0,3% B	0,098 ± 0,002 B	0,053 ± 0,008 A
D2T2	1,4% ± 0,3% B	0,076 ± 0,002 D	0,053 ± 0,008 A

Tabla 10. Concentración de dienos conjugados a través del tiempo medidos en aceite vegetal comestible aditivado con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sometido previamente a radiación, BHA, BHT y controles (mmol dienos/ kg aceite). Letras distintas muestran diferencia significativa entre los valores según el test de Tukey ($p > 0,5$).

	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15
Control ^B	7,449 ± 0,086	14,471 ± 0,131	18,265 ± 0,737	20,833 ± 1,368	37,835 ± 0,352	47,871 ± 0,540
CT1 ^{AB}	0,591 ± 0,084	1,033 ± 0,200	3,377 ± 0,317	3,796 ± 0,540	3,595 ± 0,267	14,656 ± 4,111
CT2 ^{AB}	0,628 ± 0,093	1,293 ± 0,258	3,525 ± 0,206	2,191 ± 0,131	2,613 ± 0,040	10,821 ± 2,713
D1T1 ^{AB}	0,521 ± 0,080	1,273 ± 0,206	3,318 ± 0,229	3,778 ± 0,149	5,144 ± 0,202	13,819 ± 0,405
D1T2 ^{AB}	0,528 ± 0,101	0,995 ± 0,431	1,701 ± 0,143	2,017 ± 0,119	4,135 ± 0,838	9,912 ± 1,933
D2T1 ^A	0,497 ± 0,062	0,820 ± 0,260	1,112 ± 0,061	1,226 ± 0,670	1,643 ± 0,409	12,000 ± 0,562
D2T2 ^A	0,492 ± 0,066	0,680 ± 0,125	1,213 ± 0,120	1,321 ± 0,632	1,441 ± 0,421	10,872 ± 0,246
BHT ^{AB}	7,644 ± 0,068	10,127 ± 0,086	11,763 ± 0,088	12,097 ± 0,268	17,884 ± 0,484	19,979 ± 0,898
BHA ^{AB}	6,571 ± 0,100	10,036 ± 0,190	12,578 ± 0,103	17,873 ± 0,231	17,704 ± 0,265	20,184 ± 2,601

Tabla 11. Concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico a través del tiempo medidos en aceite vegetal comestible aditivado con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sometido previamente a radiación, BHA, BHT y controles (mmol MDA/ kg aceite). Letras distintas muestran diferencia significativa entre los valores según el test de Tukey ($p>0,5$).

	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15
Control ^A	0,086 ± 0,026	0,182 ± 0,182	1,572 ± 0,367	1,672 ± 0,834	3,093 ± 3,093	10,561 ± 0,283
CT1 ^A	0,056 ± 0,030	0,616 ± 0,616	2,098 ± 0,157	2,461 ± 0,026	2,937 ± 2,937	10,250 ± 0,557
CT2 ^A	0,055 ± 0,046	0,659 ± 0,659	1,315 ± 0,062	1,645 ± 0,097	3,422 ± 3,422	10,438 ± 0,954
D1T1 ^A	0,019 ± 0,043	0,433 ± 0,433	0,979 ± 0,044	1,461 ± 0,360	1,507 ± 1,507	8,943 ± 0,394
D1T2 ^A	0,070 ± 0,036	0,046 ± 0,046	0,127 ± 0,064	0,062 ± 0,242	0,098 ± 0,098	5,233 ± 0,713
D2T1 ^A	0,116 ± 0,036	0,283 ± 0,283	0,702 ± 0,064	0,906 ± 0,242	1,028 ± 1,028	9,865 ± 0,713
D2T2 ^A	0,100 ± 0,026	0,054 ± 0,054	0,108 ± 0,079	0,036 ± 0,058	0,078 ± 0,078	5,272 ± 0,973
BHT ^A	0,046 ± 0,020	0,046 ± 0,046	0,187 ± 0,060	0,444 ± 0,208	0,571 ± 0,571	9,783 ± 0,521
BHA ^A	0,019 ± 0,008	0,136 ± 0,136	0,340 ± 0,107	0,641 ± 0,161	0,666 ± 0,666	8,982 ± 1,052

Bibliografía

- Alvarez, Suarez, Zapata,. (2011). Análisis de la industria del té y las aromáticas en Colombia: Universidad del Rosario.
- American Oil Chemists, S. (2005). *Official methods and recommended practices of the AOCS*. Champaign, Ill.: American Oil Chemists Society.
- Bailey, A. E., & Shahidi, F. (2005). *Bailey's industrial oil & fat products*.
- Barnes, P. W., Jordan, P. W., Gold, W. G., Flint, S. D., & Caldwell, M. M. (1988). Competition, Morphology and Canopy Structure in Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Wild Oat (*Avena fatua* L.) Exposed to Enhanced Ultraviolet-B Radiation. *Functional Ecology*, 2(3), 319-330. doi: 10.2307/2389404
- Baser, K. H. C. B. G. (2010). *Handbook of essential oils : science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
- Baysal, A. H., Molva, C., & Unluturk, S. (2013). UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 494-498. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.015>
- Bomgardner, M. (2014, February 10, 2014). Extending Shelf Life With Natural Preservatives. *Chemical and Engineering News*, 92.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Castro Restrepo, D. D. G., Jesus. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales*. (F. E. U. C. d. Oriente Ed.): Universidad Católica de Oriente.
- Cisneros-Zevallos, L. (2003). The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value of Fresh Fruits and Vegetables. *Journal of Food Science*, 68(5), 1560-1565. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb12291.x
- Chen, Q., Shi, H., & Ho, C.-T. (1992). Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(10), 999-1002. doi: 10.1007/bf02541065

- Dall'Acqua, S., Miolo, G., Innocenti, G., & Caffieri, S. (2012). The Photodegradation of Quercetin: Relation to Oxidation. *Molecules*, 17(8), 8898.
- Dogu-Baykut, E., Gunes, G., & Decker, E. A. (2014). Impact of shortwave ultraviolet (UV-C) radiation on the antioxidant activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 157, 167-173. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.027>
- Dolzhenko, Y., Berteza, C. M., Occhipinti, A., Bossi, S., & Maffei, M. E. (2010). UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100(2), 67-75. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.05.003>
- Doymaz, İ. (2011). Drying of thyme (*Thymus vulgaris* L.) And selection of a suitable thin-layer drying model. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(4), 458-465. doi: 10.1111/j.1745-4549.2010.00488.x
- El Ouariachi, E. M., Tomi, P., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Desjobert, J.-M., Costa, J., & Paolini, J. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 533-536. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.019>
- Erickson, D. R. (1996). Production and composition of frying fats *Deep frying chemistry, nutrition and practical applications* (pp. 4–28). Champaign, Illinois: AOCS press.
- FAO. (2001). *Codex alimentarius*. Vol. 8, Vol. 8. Rome; [Great Britain]: FAO/WHO.
- Farooqi, A. A. S. B. S. (2001). *Cultivation of medicinal and aromatic crops*. Hyderabad; London: Universities Press ; Sangam Books] (distributor).
- Fennema, O. R., Parkin, K. L., & Damodaran, S. E. (2008). *Food Chemistry*. Boca Raton: CRC Press.
- Ferhat, M. A., Tigrine-Kordjani, N., Chemat, S., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2007). Rapid Extraction of Volatile Compounds Using a New Simultaneous Microwave Distillation: Solvent Extraction Device. *Chromatographia*, 65(3-4), 217-222. doi: 10.1365/s10337-006-0130-5
- Frankel, E. N. (1989). The antioxidant and nutritional effects of tocopherols, ascorbic acid and beta-carotene in relation to processing of edible oils. *Bibliotheca nutritio et dieta*(43), 297-312.
- Guazzi, E., Maccioni, S., Monti, G., Flamini, G., Cioni, P. L., & Morelli, I. (2001). *Rosmarinus officinalis* L. in the Gravine of Palagianello (Taranto, South Italy). *Journal of Essential Oil Research*, 13(4), 231-233. doi: 10.1080/10412905.2001.9699678
- Gunstone, F. D. (2004). *The chemistry of oils and fats : sources, composition, properties, and uses*. Oxford, UK; Boca Raton, FL: Blackwell Pub. ; CRC Press.

- Gunstone, F. D. (2011). *Vegetable oils in food technology composition, properties and uses*. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell.
- Gupta, R. B. S. J.-J. (2007). *Solubility in supercritical carbon dioxide*. Boca Raton: CRC Press.
- Halliwell, B. (1999). Food-derived antioxidants. Evaluating their importance in food and in vivo. *Food science and agricultural chemistry*, 1(2), 67-109.
- Hideg, É., Jansen, M. A. K., & Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science*, 18(2), 107-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.003>
- Joint Fao/Who Codex Alimentarius Commission, J. F. A. O. W. H. O. F. S. P. (2001). *Codex alimentarius. Vol. 8, Vol. 8*. Rome; [Great Britain]: FAO/WHO.
- Kamal-Eldin, A. (2003). *Lipid oxidation pathways*. Champaign, Ill.: AOCS Press.
- Kamal-Eldin, A., & Pokorný, J. (2005). *Analysis of lipid oxidation*. Champaign, Ill.: AOCS Press.
- Karousou, R., Grammatikopoulos, G., Lanaras, T., Manetas, Y., & Kokkini, S. (1998). Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. *Phytochemistry*, 49(8), 2273-2277. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00385-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00385-9)
- Kim, K. H., & Hong, J. (1999). Equilibrium solubilities of spearmint oil components in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, 164(1), 107-115. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3812\(99\)00248-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3812(99)00248-4)
- Koşar, M., Dorman, H. J. D., & Hiltunen, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 91(3), 525-533. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.029>
- Kumari, R., Agrawal, S. B., Singh, S., & Dubey, N. K. (2009). Supplemental ultraviolet-B induced changes in essential oil composition and total phenolics of *Acorus calamus* L. (sweet flag). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), 2013-2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.02.006>
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18(6), 435-448. doi: 10.1002/ptr.1465
- Lebert, A., Tharrault, P., Rocha, T., & Marty-Audouin, C. (1992). The drying kinetics of mint (*Mentha spicata* Huds.). *Journal of Food Engineering*, 17(1), 15-28. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0260-8774\(92\)90062-B](http://dx.doi.org/10.1016/0260-8774(92)90062-B)

- Levin, D. A. (1976). Alkaloid-Bearing Plants: An Ecogeographic Perspective. *The American Naturalist*, 110(972), 261-284. doi: doi:10.1086/283063
- Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323-327. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.083>
- Luis, J. C., Pérez, R. M., & González, F. V. (2007). UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food Chemistry*, 101(3), 1211-1215. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.023>
- Maffei, M., Canova, D., Berteà, C. M., & Scannerini, S. (1999). UV-A effects on photomorphogenesis and essential-oil composition in *Mentha piperita*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 52(1-3), 105-110. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(99\)00110-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(99)00110-4)
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833-839. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>
- Matsushita, T., Inoue, S.-i., & Tanaka, R. (2010). An Assay Method for Determining the Total Lipid Content of Fish Meat Using a 2-Thiobarbituric Acid Reaction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(9), 963-972. doi: 10.1007/s11746-010-1578-x
- McClements, D. J., Decker, E., & Elias, R. J. (2010). Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Volume 1, Volume 1. from <http://site.ebrary.com/id/10654058>
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 291-312. doi: 10.1002/ffj.1961
- Ministerio de Agricultura, R. d. C. (2016). Agronet. from <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Namdeo, A. (2007). *Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review* (Vol. 1).
- O'Brien, R. D. (1998). *Fats and oils : formulating and processing for applications*. Lancaster, Pa.: Technomic Pub. Co.
- O'Brien, R. D., Farr, W. E., & Wan, P. J. (2000). Introduction to fats and oils technology. from <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kplFOTE00J/introduction-to-fats>
- Ozen, T., Demirtas, I., & Aksit, H. (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpillii* var.

- skorpilii. *Food Chemistry*, 124(1), 58-64. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.103>
- Perez, C. P., Schreiner, M., Krumbein, A., Schwarz, D., Klaring, H. P., Ulrichs, C., & Huyskens-Keil, S. (2009). Composition of Carotenoids in Tomato Fruits as Affected by Moderate UV-B Radiation before Harvest. *ACTA HORTICULTURAE*(821), 217-222.
- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., . . . Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137-150. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.033>
- Peter, K. V. (2004a). Handbook of herbs and spices. from <http://site.ebrary.com/id/10131806>
- Peter, K. V. (2004b). Handbook of herbs and spices. Volume 2 Volume 2. from <http://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpHHSV0012>
- Peter, K. V. (2006). *Handbook of herbs and spices. Volume 3 Volume 3*. Cambridge: Woodhead.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Biochem*, 37(Pt 1), 91-102. doi: 10.1042/
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(1), 91-102. doi: 10.1042/BA20020118
- Rao, E. V. S. P. G. C. T. R. R. S. G. R. S. (1999). Agronomic and Distillation Studies on Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in a Semi-Arid Tropical Environment. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 6(3), 25-30.
- Rehman, R., Hanif, M. A., Mushtaq, Z., & Al-Sadi, A. M. (2016). Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. *Food Reviews International*, 32(2), 117-160. doi: 10.1080/87559129.2015.1057841
- Reverchon, E., & Senatore, F. (1992). Isolation of rosemary oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 7(4), 227-230. doi: 10.1002/ffj.2730070411
- Robert, P., Masson, L., & Romero, N. (2001). Fritura industrial de patatas críps. Influencia del grado de insaturación de la grasa de fritura sobre la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento. *Grasas y Aceites Vol 52 Fasc 6*, 389-396.
- Shahidi, F. (2015). Handbook of Antioxidants for Food Preservation. from <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1983596>

- Shama, G. (2007). Process challenges in applying low doses of ultraviolet light to fresh produce for eliciting beneficial hormetic responses. *Postharvest Biology and Technology*, 44(1), 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.004>
- Shimizu, S. (1962). Studies on the essential oils of interspecific hybrids in the genus *Mentha*, 8. *Agricultural and biological chemistry*, 26(8), 1962-1908.
- Shirley, B. W. (1996). Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science*, 1(11), 377-382. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80312-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80312-8)
- Škrovánková, S., Mišurcová, L., & Machů, L. (2012). Chapter Three - Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. In H. Jeyakumar (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. Volume 67, pp. 75-139): Academic Press.
- Stahl-Biskup, E., & Venskutonis, R. P. (2012). Thyme *Handbook of Herbs and Spices (Second edition)* (pp. 499-525): Woodhead Publishing.
- Stankovic, M. S., Niciforovic, N., Topuzovic, M., & Solujic, S. (2011). Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity, of The Whole Plant and Plant Parts Extracts from *Teucrium Montanum* L. Var. *Montanum*, F. *Supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1), 2222-2227. doi: 10.5504/BBEQ.2011.0020
- Strycharz, S., & Shetty, K. (2002). Effect of *Agrobacterium rhizogenes* on phenolic content of *Mentha pulegium* elite clonal line for phytoremediation applications. *Process Biochemistry*, 38(2), 287-293. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00078-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00078-X)
- Sumczynski, D., Bubelova, Z., Sneyd, J., Erb-Weber, S., & Mlcek, J. (2015). Total phenolics, flavonoids, antioxidant activity, crude fibre and digestibility in non-traditional wheat flakes and muesli. *Food Chemistry*, 174, 319-325. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.065>
- Szumny, A., Figiel, A., Gutiérrez-Ortiz, A., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2010). Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 97(2), 253-260. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.10.019>
- Teranishi, R., Wick, E. L., & Hornstein, I. (1999). *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231-R1249. doi: 10.1111/1750-3841.12492

- van Esch, G. J. (1986). Toxicology of tert-butylhydroquinone (TBHQ). *Food and Chemical Toxicology*, 24(10–11), 1063-1065. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90289-9](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(86)90289-9)
- Veeresham, C., & Kokate, C. K. (2004). *Medicinal Plant Biotechnology*. New Delhi: CBS Publishers and Distributers.
- Wang, Z., Ding, L., Li, T., Zhou, X., Wang, L., Zhang, H., . . . He, H. (2006). Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Journal of Chromatography A*, 1102(1–2), 11-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.10.032>
- Wrolstad, R. E. (2005). *Handbook of food analytical chemistry*. Hoboken, N.J.: J. Wiley.
- Yanishlieva, N., Gordon, M., & Pokorný, J. (Eds.). (2001). Boca Raton, Fla.; Cambridge, England: CRC Press ; Woodhead Pub.
- Yildirim, A., Cakir, A., Mavi, A., Yalcin, M., Fauler, G., & Taskesenligil, Y. (2004). The variation of antioxidant activities and chemical composition of essential oils of *Teucrium orientale* L. var. *orientale* during harvesting stages. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(5), 367-372. doi: 10.1002/ffj.1343
- Yun, J., Yan, R., Fan, X., Gurtler, J., & Phillips, J. (2013). Fate of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and potential surrogate bacteria on apricot fruit, following exposure to UV-C light. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 356-363. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.021>
- Zhang, W. J., & Björn, L. O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80(4), 207-218. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2009.02.006>
- Zubrick, J. W., John, W., & Sons. (2014). *The organic chem lab survival manual : a student's guide to techniques*. Hoboken: Wiley.